

Os benefícios da inclusão das técnicas de biologia molecular na hemoterapia

The benefits of including molecular biology techniques in hemotherapy

Muna Ribeiro Lima Mounir, Rízia Benaya Alves Barbosa¹, Natália Ioseph Gladistone Maciel²

¹ Aluna do Curso de Biomedicina

² Professora Doutora do Curso de Biomedicina

Resumo

Introdução: A hemoterapia consiste em um conjunto de técnicas médicas que utilizam componentes sanguíneos oriundos de doadores altruístas. No Brasil, iniciou-se em 1920, com a criação dos primeiros Serviços de Transfusão de Sangue (STS). Impacto das doenças transmitidas por transfusão: A transmissão de doenças infecciosas, entre elas o vírus HIV, via transfusão, foi um dos grandes problemas enfrentados nas décadas de 1980 e 1990 no Brasil. Desde 2002, a introdução de testes de biologia molecular, incluindo o NAT (Nucleic Acid Test), buscou melhorar a detecção de doenças infecciosas. **Metodologia:** A presente pesquisa é uma revisão bibliográfica; foram selecionados artigos mais recentes sobre (i) hemoterapia, (ii) HIV, (iii) biologia molecular e (iv) testes NAT. **Referencial teórico:** análise da literatura, foram consultadas as bases de dados LILACS, SciELO e Google Acadêmico. Testes NAT e biologia molecular: O teste NAT foi implementado à época, por permitir detectar os vírus, como HIV, HCV e HBV, mais precocemente, reduzindo a janela imunológica (período que ocorre entre a infecção e a capacidade do organismo em detectar a infecção via anticorpos), além de ser um exame altamente sensível. Essa técnica, que se baseia na PCR em tempo real, amplifica o material genético que o vírus carrega, possibilitando maior sensibilidade na detecção das infecções. **Conclusão:** O teste NAT foi crucial para a segurança do sangue transfundido no Brasil, aumentando a eficácia na triagem de doadores e reduzindo a transmissão de doenças infecciosas. A doação altruísta e as campanhas de conscientização também são elementos chave para garantir a segurança nas transfusões.

Palavras-chave: hemoterapia, STS, HIV, testes NAT, PCR, hepatite C, hepatite B, janela imunológica

Abstract

Introduction: Hemotherapy consists of a set of medical techniques that use blood components from altruistic donors. In Brazil, it began in 1920, with the creation of the first Blood Transfusion Services (STS). Impact of transfusion-transmitted diseases: The transmission of infectious diseases, including the HIV virus, via transfusion, was one of the major problems faced in the 1980s and 1990s in Brazil. Since 2002, the introduction of molecular biology tests, including the NAT (Nucleic Acid Test), has sought to improve the detection of infectious diseases. **Study methodology:** The present research is a literature review; more recent articles on (i) hemotherapy, (ii) HIV, (iii) molecular biology, and (iv) NAT tests were selected. **Theoretical Framework:** the literature, the LILACS, SciELO and Google Scholar databases were consulted. NAT tests and molecular biology: The NAT test was implemented at the time, as it allows the detection of viruses, such as HIV, HCV and HBV, earlier, reducing the immunological window (the period that occurs between infection and the body's ability to detect infection via antibodies), in addition to being a highly sensitive test. This technique, which is based on real-time PCR, amplifies the genetic material that the virus carries, enabling greater sensitivity in detecting infections. **Conclusion:** The NAT test was crucial for the safety of transfused blood in Brazil, increasing the effectiveness in donor screening and reducing the transmission of infectious diseases. Altruistic donation and awareness campaigns are also key elements to ensure the safety of transfusions.

Keywords: hemotherapy, STS, HIV, NAT tests, PCR, hepatitis C, hepatitis B, immunological window

Contato: rizia.barbosa@souicesp.com.br; munarlimounir3@gmail.com.br; natalia.maciel@icesp.edu.br

Introdução

A hemoterapia é um conjunto de técnicas onde há o emprego terapêutico do sangue, sendo os componentes sanguíneos obtidos a partir de uma doação altruísta, passando por processamento, se tornando hemocomponentes viáveis à transfusão (Lorenzi, 2002).

No Brasil, essa técnica foi implantada em 1920, por um grupo de médicos cirurgiões do Rio de

Janeiro, dando origem aos primeiros STS (Serviço de Transfusão de Sangue), no entanto os protocolos de doação remunerada trouxeram grandes danos para a saúde pública (Lorenzi, 2002).

A partir da década de 1980, o Ministério da Saúde visualizou que os protocolos pré-transfusionais não eram seguros, por isso havia uma alta taxa de transmissão de doenças infecciosas pelas transfusões, sendo a principal delas o HIV. Com o objetivo de recuperar essa

desastrosa implementação da hemoterapia no território nacional cria-se a Política Nacional do Sangue e Hemoderivados (Pró-Sangue), trazendo o conceito de doação não remunerada, testagem laboratorial dos doadores, critérios clínicos de exclusão e inclusão de doadores e popularização da doação com ato de empatia e não remuneração (Junqueira, 2002).

A necessidade de uma testagem laboratorial dos doadores e dos hemocomponentes transfundidos se deu também, pois em 1981 o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos foi reconhecido como entidade nosológica e associando as transfusões como meio de contágio. No Brasil, cerca de 50% dos hemofílicos haviam contraído HIV por meio de transfusão, quase 30% das doações eram de doadores recorrentes contaminados com HIV (Hamerschlak, Pasternak, 1991).

Diante desse cenário, no ano de 2004, diversos processos foram implementados à triagem de doadores, sendo a última delas, com objetivo de diminuir a transmissão de ISTs a introdução de técnicas de biologia molecular – os testes NAT – Tecnologia da Amplificação de Ácidos Nucleicos (Brasil, 2004).

Associado aos testes sorológicos, detecção de antígeno e anticorpo, o NAT tem como função diminuir a janela imunológica, pois identifica o RNA ou DNA viral com maior especificidade de sensibilidade. Diante desses benefícios e eficácia das técnicas associadas, o Ministério da Saúde tornou obrigatório o teste NAT em todas as bolsas de sangue em 2013 (Brasil, 2013).

Metodologia

Esse trabalho consistiu em uma revisão bibliográfica sistemática onde os critérios de inclusão foram: ano de publicação e impacto da pesquisa, relevância do tema e associação com as palavras-chave, sendo priorizados os artigos originais.

Diante do trabalho realizado, utilizamos como critérios de integração apenas artigos dos últimos anos, com algumas palavras-chave como: hemoterapia, NAT, HIV, biologia molecular.

Para este trabalho, foram utilizadas bases de dados como LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Electronic Library) e Google Acadêmico. Essas bases de dados foram escolhidas pela importância e pela quantidade de material relevante que oferecem.

Referencial Teórico

I – A história da hemoterapia e a implementação das técnicas de biologia molecular

O Brasil, quando comparado com os demais países desenvolvidos, iniciou sua prática hemoterápica de forma tardia, somente cerca de 50 anos atrás (Lorenzi, 2002). Essa diferença histórica se dá pela forma de colonização, e pouca estrutura na formação de um corpo clínico (Hamerschlak, Pasternak, 1991).

Diante da falta de estrutura de ensino e pesquisa disponíveis e a priorização de outras demandas sanitárias, apenas em 1879 o primeiro documento falando sobre transfusão veio à tona, com uma tese de doutorado associada à primeira transfusão documentada em território nacional (Junqueira, 2005).

Outro marco importante foi a realização da primeira transfusão bem-sucedida com aplicação clínica no Brasil, ocorrida na Bahia em 1915. O médico Garcez Fróes transfundiu 129 mL de sangue de um doador para uma paciente em metrorragia, utilizando um aparelho de Agote improvisado (Junqueira, 2005).

Em meados dos anos 30, os primeiros serviços especializados em transfusão já estavam sumariamente organizados. Em sua formação, além da equipe médica eles, contavam com um grupo cadastrado de doadores do tipo sanguíneo “O”, o tipo sanguíneo universal, que eram remunerados a cada doação. Os doadores que cumpriam a agenda de vacinação recebiam 700 réis, enquanto os que não cumpriam, recebiam 500 réis (Lorenzi, 2002).

Em 1942, foi inaugurado, no Rio de Janeiro, o Banco de Sangue do Instituto Fernandes Figueira, sendo esse responsável em suprir a necessidade do hospital e atender a demanda por plasma humano nas frentes de guerra. No mesmo ano, foi fundado o Banco de Sangue da Santa Casa em Porto Alegre e em 1943, quando surgiu o Banco de Sangue do Hospital das Clínicas em São Paulo associado à Universidade de São Paulo (Junqueira, 2002).

Por fim, dentre os marcos importantes, em São Paulo ocorreu o I Congresso Paulista de Hematologia. Esse congresso foi importante por reunir os profissionais do setor e funcionar como um propulsor para que em 1950 a Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (SBHH) (Hamerschlak, 2011).

A SBHH foi a principal opositora a comercialização de sangue, pois com os debates nacionais vários empresários perceberam que o sangue poderia gerar mais lucro, porém era notório que havia um aumento na transmissão de doenças (Saraiva, 2005).

Somente em maio de 1980, o estado de São Paulo determinou o fim das doações remuneradas, lançando o Programa Nacional do Sangue (Pró-sangue), no qual se posicionava a favor da doação voluntária de sangue e estabelecia um projeto de estatização da hemoterapia. Os dois primeiros hemocentros públicos foram instalados a partir de 1982, em Pernambuco e Ceará (Celso, 2005).

O Pró-Sangue começou um processo de investigação nacional da segurança transfusional, no qual o primeiro ponto visualizado foi uma relação de doadores com Chagas e a transmissão do *Trypanosoma cruzi* pela transfusão. Estima-se que na década de 1980 apareceram cerca de 20 mil novos casos de doenças de chagas, tornando as transfusões umas das principais formas de transmissão de doenças de chagas em países endêmicos (Dias, 2006).

Apesar desse quadro de contaminação óbvia para doenças com transmissibilidade pelo sangue, a atenção com a segurança do sangue apenas aconteceu, assim como internacionalmente, com a pandemia de HIV. De forma tardia, o Ministério da Saúde em 1987 determinou que fossem obrigatórios os testes sorológicos para HIV, através da Lei nº 7.649, de 25 de Janeiro de 1988. No Brasil, cerca de 50% dos hemofílicos haviam contraído HIV por meio de transfusão, quase 30% das doações eram de doadores recorrentes contaminados com HIV (Hamerschlak, Pasternak, 1991).

Entre 1980 e 1990, foram notificados 25.513 casos de HIV/AIDS no Brasil, 80% deles em homens, acreditasse que 15% das contaminações eram por transfusão de sangue (Santos, 2002).

A partir 1989, a Portaria Federal nº 721 (DE 9 DE AGOSTO DE 1989) trouxe regulamentações específicas para a hemoterapia, e a Lei 10.205 (de 2001) que regulamentou a coleta, processamento, estocagem, distribuição e aplicação do sangue, seus componentes e derivados, e estabeleceu critérios para a execução dessas atividades. Essa Portaria determina ainda, a utilização exclusiva de doação voluntária e não remunerada de sangue, servindo até os dias de hoje (Brasil, 2002).

Com a chegada desta portaria, iniciou a implementação nacional da realização do teste de ácido nucleicos (NAT) nos bancos de sangue para a triagem dos vírus da Hepatite C e da Imunodeficiência Humana Adquirida – HIV, no caso de positividade nos testes sorológicos (Brasil, 2002).

Contudo, apesar da obrigatoriedade do teste NAT ter sido declarada em 2002, sua implementação foi um processo demorado devido à falta de kits diagnósticos registrados no país e ao preço elevado do produto no mercado internacional

(Brasil, 2002).

Por esse motivo, somente em 2013, o Ministério da Saúde sancionou uma lei com obrigatoriedade do NAT em todas as doações de sangue para Hepatite C e HIV, associadas à Resolução de Boas Práticas no Ciclo do Sangue. O documento cumpre o papel de um manual com todas as exigências que devem ser obedecidas por qualquer serviço hemoterápico no Brasil (Koichi, 2018).

II – O teste diagnóstico baseado na amplificação de ácidos nucleicos (NAT)

Os testes de ácidos nucleicos (NAT) são ferramentas complementares aos testes sorológicos para controle da transmissão de doenças infecciosas por meio de produtos obtidos a partir do sangue (Brasil, 2002).

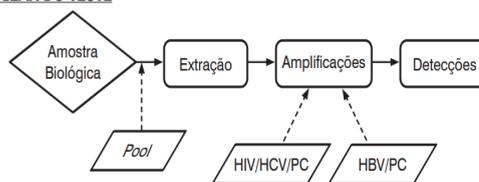
Sendo um teste que possui alta sensibilidade para detecção da presença do genoma viral do HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana), HCV (Vírus da Hepatite C) e HBV (Vírus da Hepatite B) circulante no plasma sanguíneo. Desta forma, é possível detectar estes agentes patogênicos no período que antecede a produção de anticorpos pelo organismo, conhecido como janela imunológica. Assim, há redução no tempo de detecção do HIV, HBV e HCV quando comparados aos testes sorológicos, passando de 21, 60 e 70 dias após a exposição, respectivamente, para apenas 10 a 12 dias (Manual Bio-Manguinhos, 2022).

O teste conhecido como “NAT nacional”, tem como base a plataforma de PCR em tempo real, que por meio de um marcador fluorescente permite visualizar a reação de amplificação de uma sequência de nucleotídeos (Manual Bio-Manguinhos, 2022).

O fluxo metodológico possui as seguintes etapas:

- Preparo de amostras em pool (conjunto) de 6 ou individual;
- Extração de ácido nucléico da amostra biológica (plasma);
- Amplificação do ácido nucleico;
- Detecção do ácido nucleico por PCR em tempo real

ESQUEMA DO TESTE



(Figura 1: fluxo metodológico do kit NAT HIV/HCV/HBV – Bio Manguinhos. Fiocruz (2022, p. 02).

Na etapa de preparo de *pool*, com 6 amostras, é feita de forma manual, após coleta de sangue periférico do doador. Em tubo de separação de plasma, o plasma coletado será somado ao das outras amostras. Caso positivo, todas as amostras serão testadas individualmente (Manual Bio-Manguinhos, 2022).

Quando o pool já está preparado é acrescentado pelo profissional manipulador uma partícula calibradora, que terá como função validar o resultado e controlar as condições da reação (Manual Bio-Manguinhos, 2022).

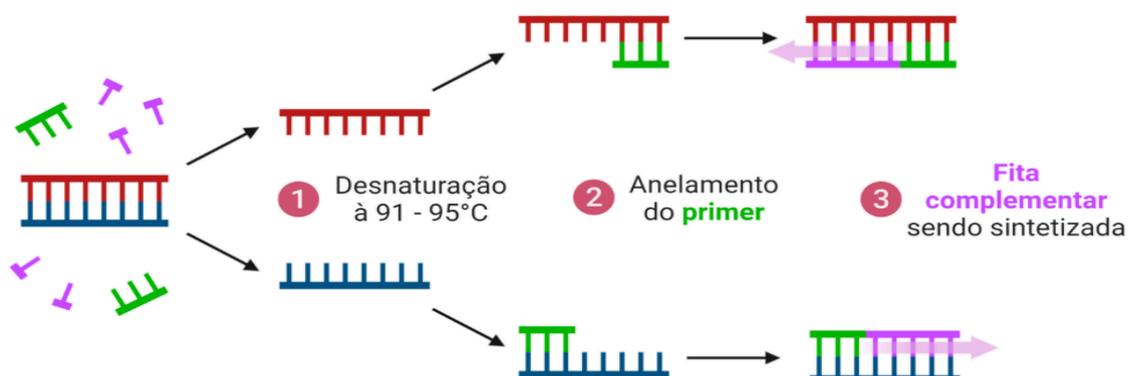
O processo de extração é totalmente automatizado, e através das propriedades de ligação seletiva da membrana de sílica é feita a recuperação dos ácidos nucleicos. Essa etapa ocorre com a lise da amostra, em uma temperatura elevada de 56 °C, e com a adição do etanol ocorre a exposição do ácido nucleico, se ligando a membrana de sílica. Após essa ligação é realizada algumas etapas de lavagem e o material genético está disponível para ser amplificado (Manual Bio-Manguinhos, 2022).

A etapa de amplificação é específica ao alvo investigado, no caso HIV, HCV, HCB e partícula controle, em que por meio de uma sonda específica marcada com uma fluorescência o equipamento irá amplificar essa sequência à níveis detectáveis. Essa metodologia possui como princípios a reação em cadeia da polimerase na qual a reação ocorre ciclicamente através de uma série de alterações de temperatura, gerando várias cópias da sequência (Figura 1) (Manual Bio-Manguinhos, 2022).

responsável.

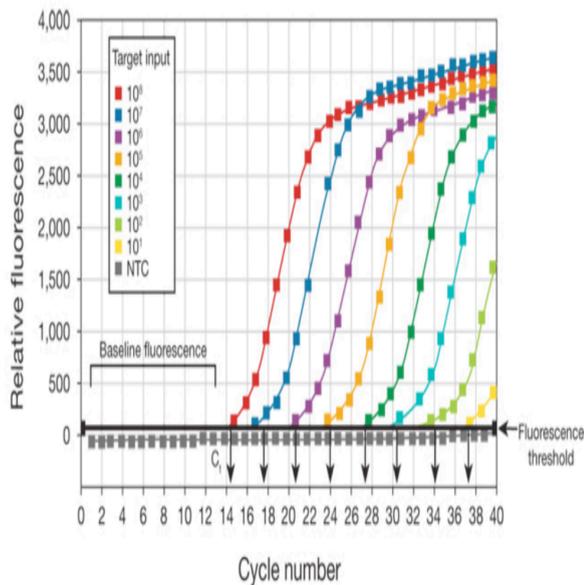
A interpretação do teste se dá seguinte forma:

- a) Amostra não detectável e partícula controle positivo: liberar o resultado das amostras.
- b) Amostra não detectável e partícula calibradora não detectável: repetir a amostra e controle novamente.
- c) Amostra detectável e partícula calibradora detectável: se for em pool repetir individualmente para verificar qual amostra está alterada, se for individual liberar o resultado.
- d) Amostra detectável e partícula calibradora não detectável: refazer testagem.



(Figura 2: 7 de julho de 2023/por Redação Cursau)

Quando atinge níveis detectáveis, o aparelho de leitura reproduz essa curva de amplificação em um gráfico, que será analisado pelo profissional



(Figura 3: fonte: Thermofisher)

III - Benefícios da implementação do NAT

O NAT, apresenta a capacidade de amplificar sequências de ácidos nucleicos provenientes do genoma de um organismo ou vírus, sendo está

a principal vantagem do teste, pois, uma vez que amplifica o material genético do próprio vírus infectante, permite diminuir a denominada janela imunológica (Brasil, 2002)

Desse modo, em conjunto com os testes sorológicos, quando realizado nos serviços de hemoterapia, agrega segurança transfusional e qualidade, uma vez que as técnicas se complementam. A primeira é relevante para detectar precocemente os antígenos virais nos estágios logo após a infecção e, a segunda, para detecção de antígenos e anticorpos, minimizando o risco infeccioso das transfusões (Santos, 2024).

A transmissão dos agentes infecciosos por transfusão pode ocorrer quando o doador recém-infectado não é identificado na triagem clínica, quando o analito não for detectável no NAT e não for positivo ainda na sorologia (Brasil, 2002).

Estudos atuais, mostram que desde a implementação da técnica NAT, em 2002, e sua obrigatoriedade, em 2013, somente na Fundação Hemominas foram realizadas 1.387.698 doações de repetição, sendo respectivamente, positivas para HIV, HCV e HBV, 1073, 1147, 511 diagnósticos positivos. Onde anteriormente a técnica NAT e adventos sorológicos, havia cerca de 15% de contaminação (Santos, *et al.*, 2020)

No caso do Hemocentro do Pará, no ano de 2020 a junho de 2024, foram verificadas 235.298 doações, ocorrendo soroconversão em 305 para HCV, 278 PARA hiv e 215 HBV, cerca de 1 a 2% do valor total de transfusões (Santos, 2024).

A implementação do teste NAT foi um grande divisor dentro da hemoterapia nacional, permitindo ao receptor do sangue uma transfusão mais segura e uma metodologia mais eficaz (Santos, 2024).

Considerações finais

A segurança do paciente sempre deve ser priorizada e metodologias diagnósticas sempre devem ser discutidas. A implementação da técnica NAT foi essencial no controle e triagem de doadores, garantindo uma grande redução na transmissibilidade de doenças infecciosas virais.

A implementação da técnica NAT, as doações não remuneradas, campanhas de doações altruístas e uma triagem clínica específica tornam a segurança do paciente priorizada.

Agradecimentos:

Gostaríamos de expressar nossa sincera gratidão à professora Natália Ioseph Gladistone Maciel, que foi essencial para a realização deste trabalho. Sua orientação foi fundamental, não apenas no desenvolvimento do conteúdo, mas também para a compreensão aprofundada da Biomedicina, com seu foco específico em Hemoterapia. Agradecemos por compartilhar seu conhecimento e experiência, sempre de forma atenciosa e dedicada, ajudando a ampliar nossa visão sobre a importância dessa área para a saúde. Queríamos agradecer também a contribuição de todos os professores da Biomedicina Icesp, que foram decisivos para nosso crescimento acadêmico e profissional.

Referências:

Bio-Manguinhos. Teste para detecção de ácido nucléico de HIV, HCV e HBV., Fiocruz. 2022.

Brasil. Ministério da Saúde. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n°. 153, de 14 de junho de 2004 - Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. [on line] Brasília, DF: Anvisa; 2004.

Dias J. Doença de Chagas e transfusão de sangue no Brasil: vigilância e desafios. Rev Bras Hematologia Hemoterapia 2006; 28: 167-170.

Guerram Celso. Fim da doação remunerada de sangue no Brasil faz 25 anos. Ver Bras Hematologia Hemoterapia 2005; 27:1-3.2005.

Hamerschlak N, Pasternak J. Doenças transmissíveis por transfusão. ANDREI. São Paulo, 1991.

Hamerschlak, N. História da Hematologia. Rev Bras Hematologia e Hemoterapia 2011;.33:.82-83.

Junqueira, PC. Walter Oswaldo Cruz (1910-1957). Rev Bras Hematol Hemoter 2002;24(2)155-157.

Junqueira P, Rosenblit J, Hamerschlak N. História da Hemoterapia no Brasil. Rev Bras Hematologia Hemoterapia 2005; 27: 201-205

Koichi M, Corrêa M. A incorporação do teste diagnóstico baseado na amplificação de ácidos nucleicos (NAT) para triagem de sangue no SUS: arranjos tecnológicos para a nacionalização do "NAT brasileiro. Physis: Rev Saúde Coletiva 2018.

Lorenzi TF, Jamra M (in memorian). História da Hematologia Brasileira. Fundação Maria Cecília Souto Vidigal. São Paulo 2002, 137-138. Ministério da Saúde. Portaria n° 262, de 5 de fevereiro de 2002. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvvs/saudelegis/gm/2002/prt0262_05_02_2002.html. Acesso em: 05 nov 2024.

PLMD Santos, EYS Costa, JPDR Lima, PHDS Fernandes, CHC Silva, JS Oliveira, NP Rodrigues, RR Silva, NL Silva, GM Araújo, Prevalência de Soroconversão Doenças Transmitidas Por Transfusão Entre Doadores De Sangue No Hemocentro Do Pará, Hematology, Transfusion and Cell Therapy, Volume 46, Supplement 4,2024.

Santos LG. Hemope e Pró-Sangue duas decisões um caminho EDUPE. Recife-PE 2002

Saraiva JC. A história da Hemoterapia no Brasil. Rev bras hematologia e hemoterapia 2005; 27:153-168.