

ALGORITMI DI VALIDAZIONE: IL GRUPPO DI LAVORO REGIONALE

Livia Raffaele

Dipartimento di Medicina Trasfusionale ed Ematologia,
Ospedale "Alessandro Manzoni", Lecco

Sistema Socio Sanitario



Regione
Lombardia

ASST Lecco

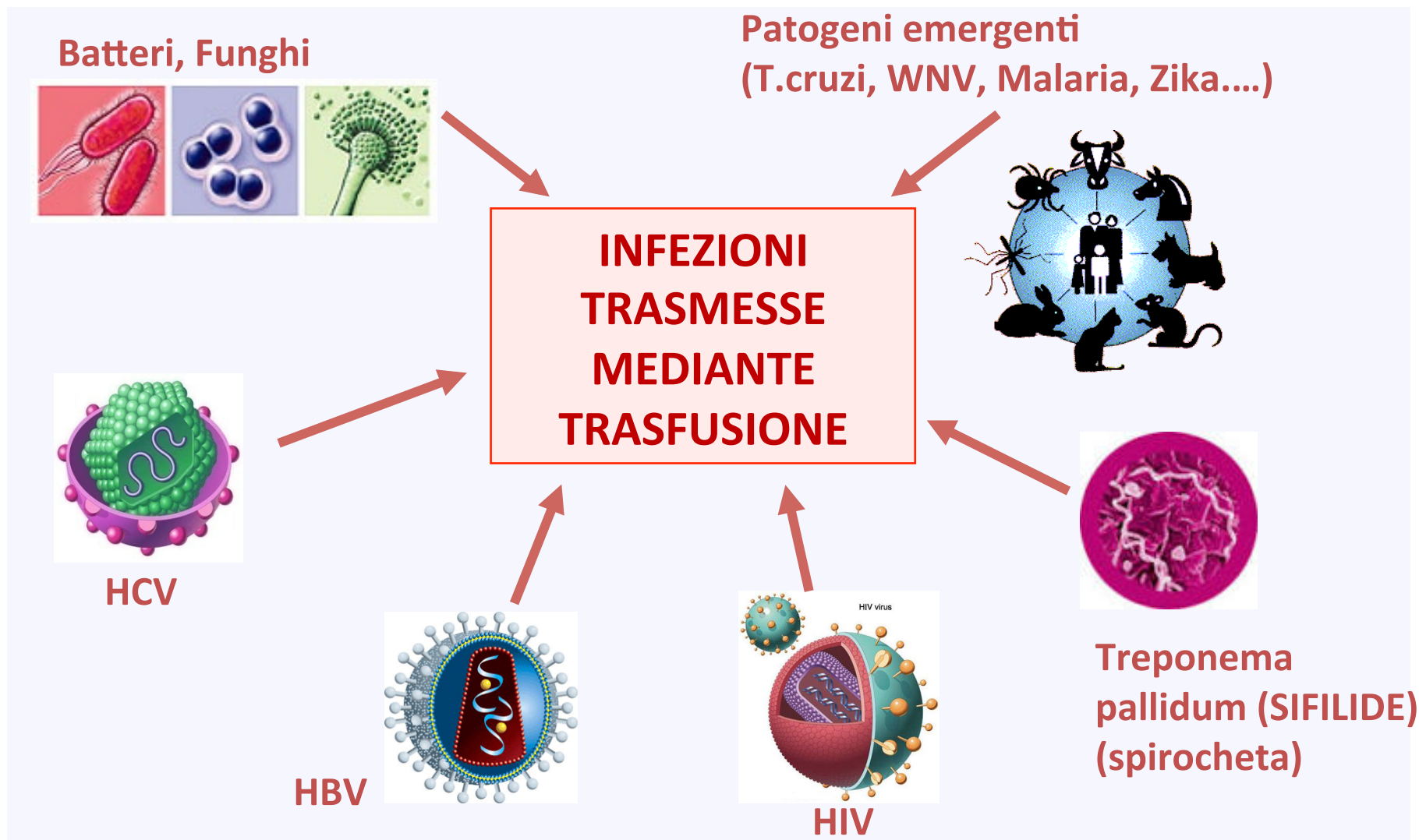


To date

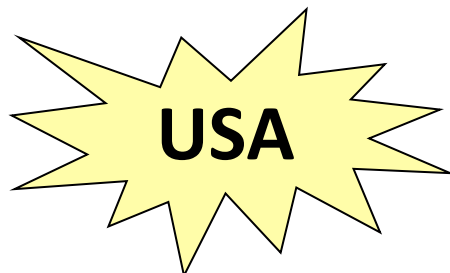
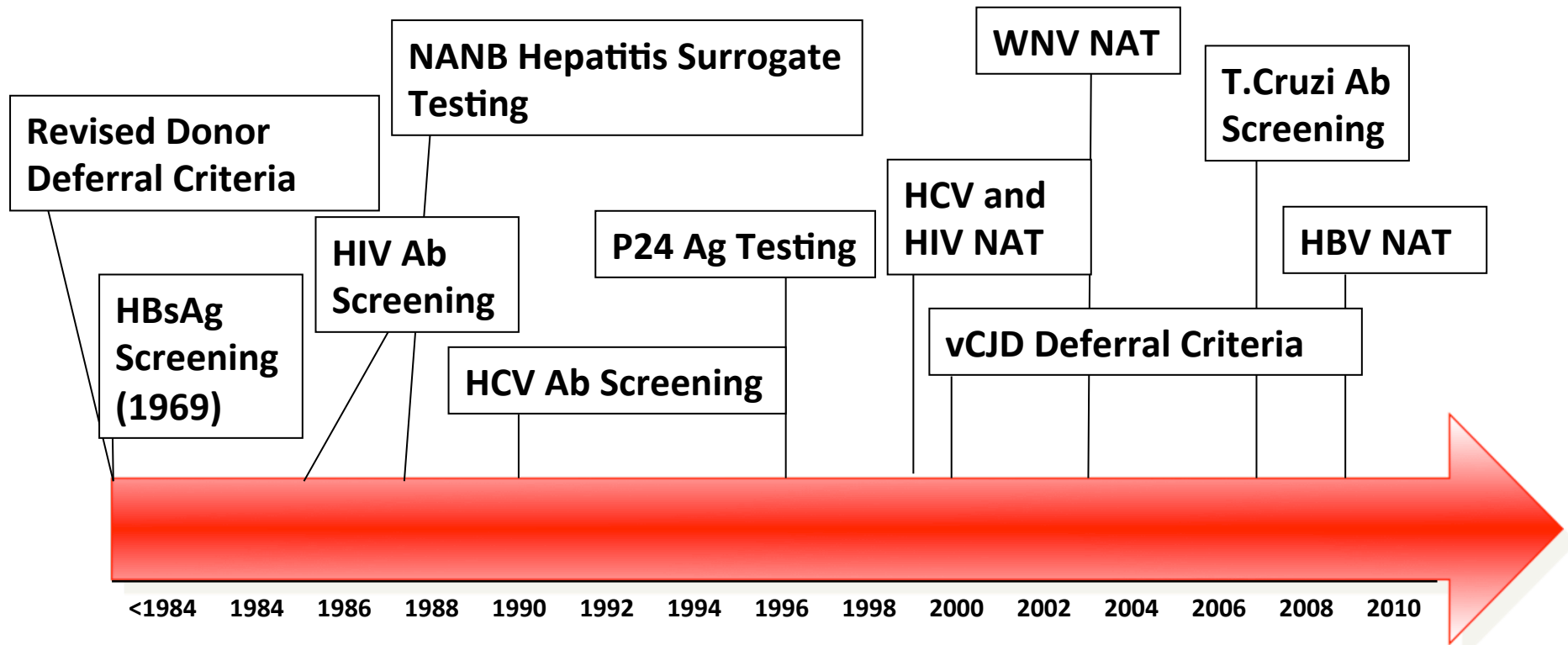
Assuring safe and effective products: how do we get this?

- Selection of low-risk donors includes use of screening questions to elicit risk factors known to be associated with transmissible infections
- Donor arm disinfection method
- **Screening tests on the units collected: sensitivity and specificity**
- Good Manufacturing Practices in preparation of blood components
- **Sufficient stocks of safe blood**
- Pathogen reduction technologies
- Patient blood management (avoiding unnecessary transfusions)
- Hemovigilance

Transfusion Transmission Infection (TTI)



Transfusion-associated infections: 50 years of remarkable progress



..... in Italy

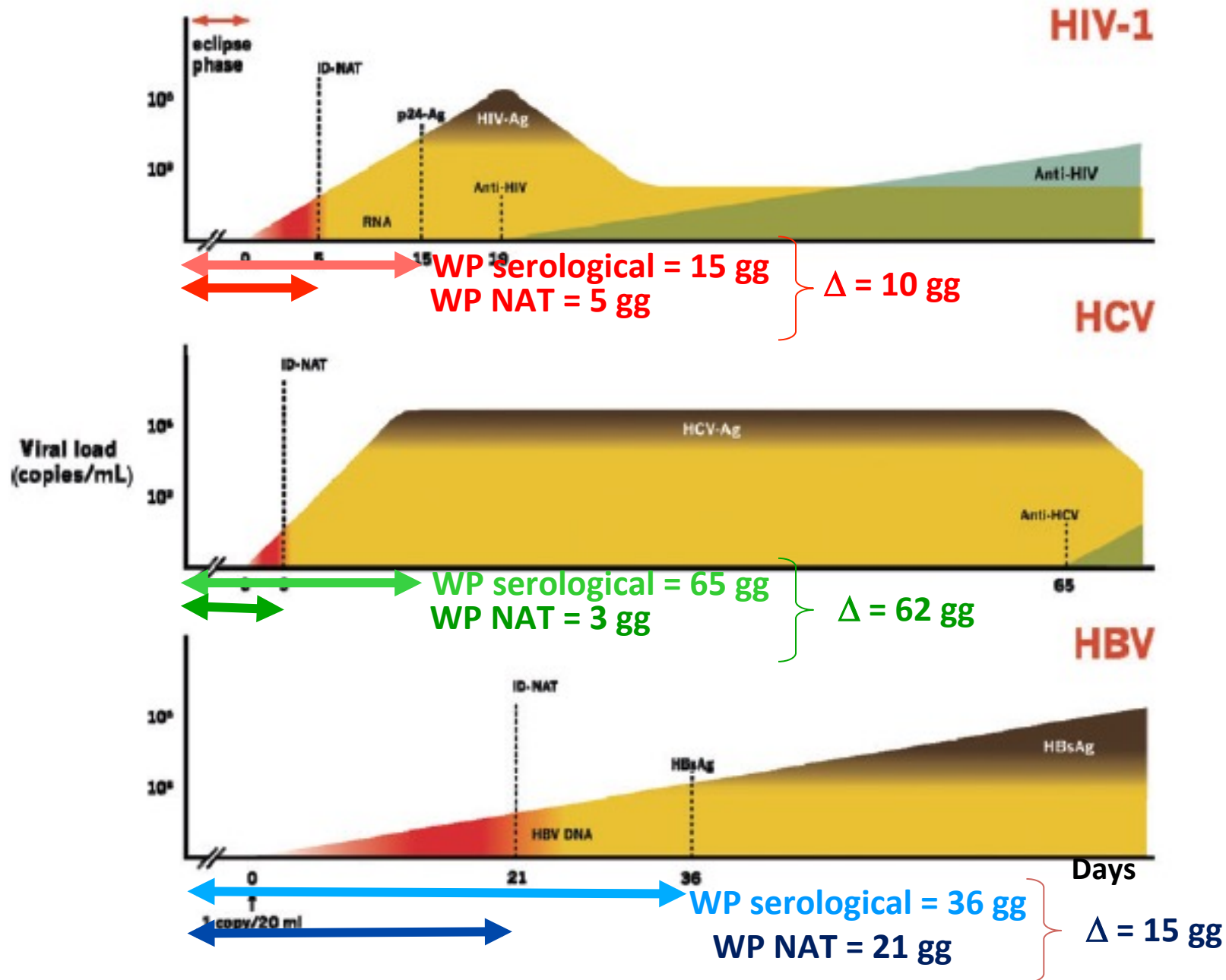
NAT became mandatory in Italy in:

- ✓ **June 2002 HCV**
- ✓ **April 2006 HIV**
- ✓ **April 2006 HBV**

Sensitivity NAT tests: cost/benefit approach

	6 MP-test	ID-test
HBV	20 IU/mL	5 IU/mL
HCV	42 IU/mL	10.7 IU/mL
HIV	165 cp/mL	49 cp/mL

HIV-1, HCV, and HBV infectivity



Mono-target versus dual-target screening NATs

Transfusion Medicine
and Hemotherapy

Original Article

Transfus Med Hemother 2014;41:45–51
DOI: 10.1159/000357103

Received: July 02, 2013
Accepted: October 16, 2013
Published online: December 19, 2013

Risk Minimization Measures for Blood Screening HIV-1 Nucleic Acid Amplification Technique Assays in Germany

Michael Chudy^a Julia Kress^a Jochen Halbauer^b Margarethe Heiden^c Markus B. Funk^b
C. Micha Nübling^a

Volume 52, February 2012 TRANSFUSION

Blood screening nucleic acid amplification tests for human immunodeficiency virus Type 1 may require two different amplification targets

*Michael Chudy, Marijke Weber-Schehl, Lutz Pichl, Christine Jork, Julia Kress, Margarethe Heiden,
Markus B. Funk, and C. Micha Nübling*

Several publications describe HIV-1 RNA false-negative results or viral load underquantitation associated with Communauté Européenne(CE)-marked qualitative or quantitative nucleic acid amplification technique (NAT) assays. 6 cases occurred during blood screening in Germany, with 2 of them causing HIV-1 transmissions to recipients of blood components. **The implicated NAT assays were mono-target assays amplifying in different viral genome regions (*gag* or long terminal repeat).**

Effect of pool testing on HBV DNA yield

Up-To-date

Challenges in hepatitis B detection among blood donors.

[Allain JP](#), [Cox L](#).

Department of Haematology, University of Cambridge, Cambridge, UK.

jpa1000@cam.ac.uk

Curr Opin Hematol. 2011 Nov;18(6):461-6. doi: 10.1097/MOH.

0b013e32834bac10. Review.

Head-to-head comparison of two transcription-mediated amplification assay versions for detection of hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus Type 1 in blood donors.

[Grabarczyk P](#), [van Drimmelen H](#), [Kopacz A](#), [Gdowska J](#), [Liszewski G](#), [Piotrowski D](#), [Górska J](#), [Kuśmierczyk J](#), [Candotti D](#), [Lętowska M](#), [Lelie N](#), [Brojer E](#).

[Transfusion](#). 2013 Apr 17. doi: 10.1111/trf.12190. [Epub ahead of print]

There are many studies that testify to the greater NAT test sensitivity run as individual test. Moreover the more efficient new chemistry in TMA assay significantly improves the sensitivity in detecting HBV.

EMOVIGILANZA Regione Lombardia 2012

Rischio trasfusionale residuo

Virus	N totale unità 2001-2012	N casi	Yield NAT +/EIA- (10 ⁶)	Rischio trasfusionale residuo	
				N°Unità / Unità prelevate (CI 95%)	N°Unità / 10 ⁶ Donazioni (CI 95%)
HCV	6.115.689	6	0,98	1 : 20.000.000 (10.000.000 – 33.000.000)	0,05 (0,03 – 0,1)
HIV	5.350.750	8	1,5	1 : 1.428.000 (400.000 – 5.000.000)	0,7 (0,2 – 2,5)
HBV	3.930.636	155	39,5	1 : 625.000 (435.000 – 50.000.000)	1,6 (0,02 – 2,3)

Occult HBV Infection (OBI)

Journal of Hepatology 49 (2008) 652–657

Statements from the *Taormina* expert meeting on occult hepatitis
B virus infection[☆]

Giovanni Raimondo^{1,*}, Jean-Pierre Allain², Maurizia R. Brunetto³,

DEFINITION:

- Presence of HBV DNA in the liver (with detectable or undetectable HBV DNA in the serum) of individuals testing HBsAg negative

- HBV DNA IS THE ONLY RELIABLE DIAGNOSTIC MARKER OF OBI
- Usually low HBV DNA level (<200 IU/mL)
- Fluctuant HBV DNA level
- **OBI can be transmitted by blood transfusion [Candotti et al., J Hepatol 2009]**

Decreto 2 Novembre 2015

Esami obbligatori ad ogni donazione con obbligo di ripetizione in doppio delle iniziali reattività (IR):

- HIV Ab Ag (Combo)
- HCV Ab
- HBsAg
- LUE
- HIV-HBV-HCV NAT
- WNV NAT (stagionale)

Quali novità?

- Plasmodium spp Ab
- T. Cruzii Ab

Quale nuovo approccio?

- Nel caso di test sierologico RR, NAT negativo e test di conferma negativo:
 - eseguire un secondo test sierologico ; se negativo valutare se riammettere il donatore secondo protocollo validato
- Eseguire test NAT in singolo alle ripetizioni e controlli



Progetto di miglioramento

Tavolo tecnico per la standardizzazione dei test infettivologici di qualificazione degli emocomponenti e la relativa gestione del donatore.

Survey dei CLV Lombardi - test sierologici

- METODICA usata per i test di screening (HBsAg, HCVAb, HIV1-2 Ag/Ab; Lue):
 - CMIA – CLIA Combo
- SISTEMA usato per i test di screening (HBsAg, HCVAb, HIV1-2 Ag/Ab; Lue):
 - ABBOTT: 5/6 (83%)
 - DiaSorin: 1/6 (17%)
- VALUTAZIONE dei risultati:
 - Zona grigia negativa (10-30% del valore soglia). L'adozione di una variabilità intorno al valore soglia predefinito dalle ditte, basata su una valutazione della imprecisione dei metodi derivata sia dagli inserti dei metodi stessi che da dati di letteratura
- Presenza protocollo operativo di conferma da utilizzare in caso di IR-RR
- Tempo medio di risposta: 5-7 giorni
- METODOLOGIE DI CONFERMA:
 - Seconda linea diagnostica-Immunoblotting-Neutralizzazione-PCR-TPPA-RPR

Raccolta dati - Tavolo tecnico

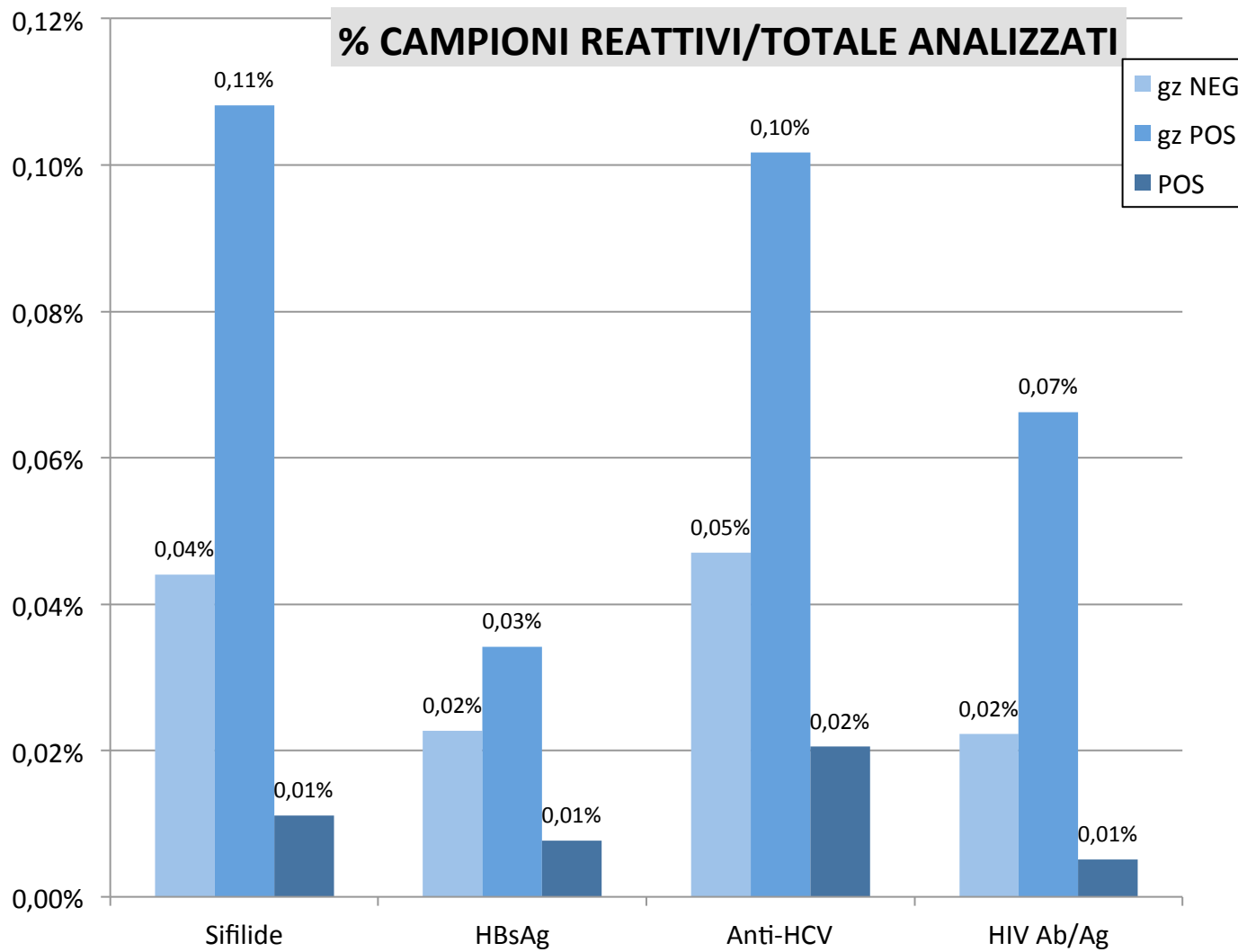
- E' stata effettuata una indagine retrospettiva su 233.395 donatori di sangue pervenuti alla donazione nel 2015, su tutto il territorio lombardo
- Sono state valutate tre fasce di reattività ai test di screening, espresse come s/co. E' stato ipotizzato un valore di PPV

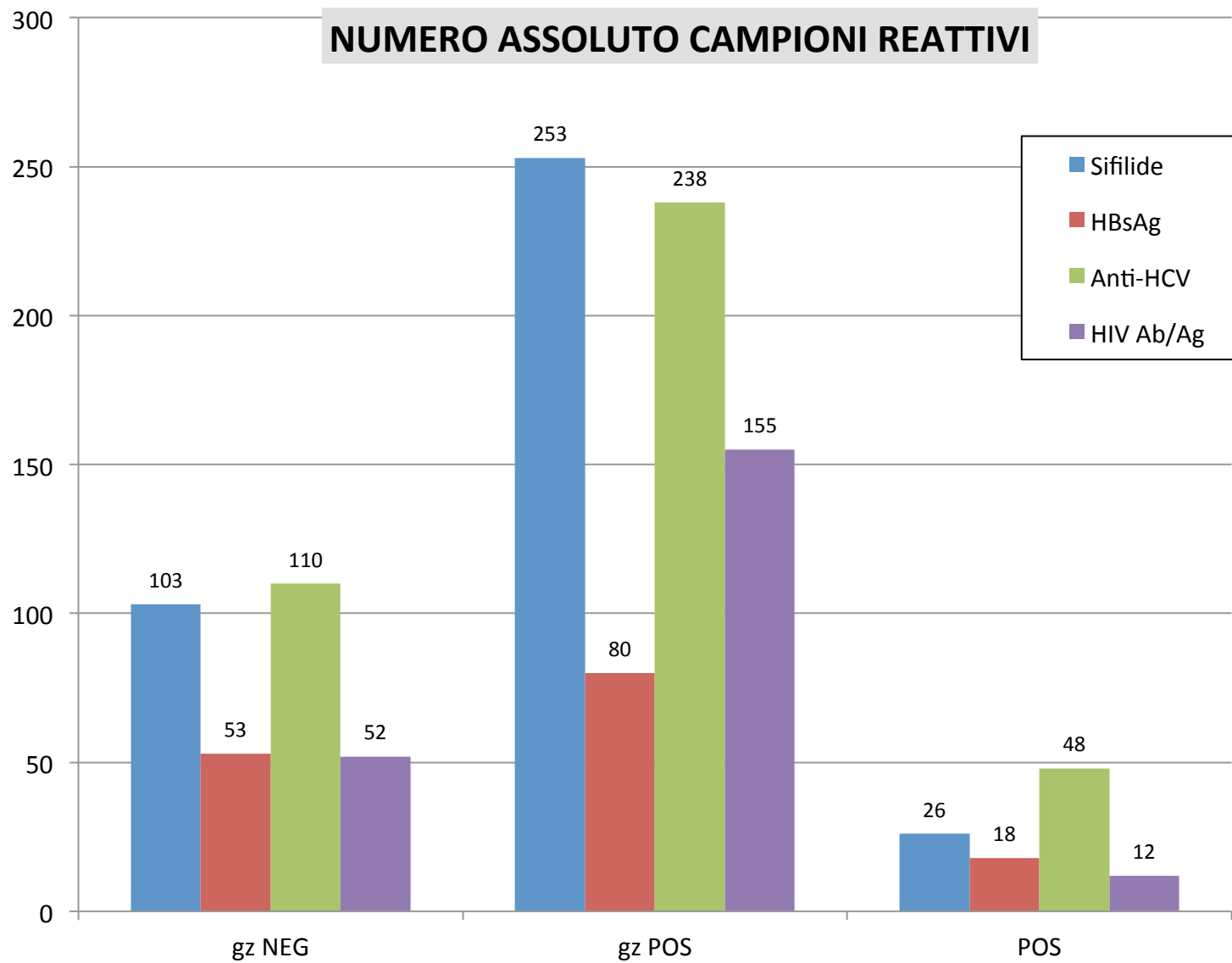
	S/CO
Sifilide	0,70-0,99
	1,00-4,35
	>4,35
HBsAg	0,70-0,99
	1,00-50
	>50
Anti-HCV	0,70-0,99
	1,00-2,50
	>2,50
HIV Ab/Ag	0,70-0,99
	1,00-10
	>10

- Sono state valutate le indagini di conferma sui campioni reattivi

	Classificazione s/co	Test screening reattivo		Test conferma		
		numero	%	num positivi	num negativi	% confermati
Lue	0,70-0,99	103	0,04%	0	103	0,0%
	1,00-4,35	253	0,11%	0	121	0,0%
	>4,35	26	0,01%	18	8	69,2%
HBsAg	0,70-0,99	53	0,02%	0	49	0,0%
	1,00-100	80	0,03%	6	63	2,3%
	>100	18	0,01%	13	5	46,4%
HCV-Ab	0,70-0,99	110	0,05%	0	100	0,0%
	1,00-2,50	238	0,10%	11	172	2,2%
	>2,50	48	0,02%	22	25	32,4%
HIV 1-2 comb o	0,70-0,99	52	0,02%	0	46	0,0%
	1,00-70	155	0,07%	2	97	0,3%
	>70	12	0,01%	8	3	34,8%
Totale		1148	0,49	78	903	6,8

Tavolo tecnico validazione biologica emocomponenti





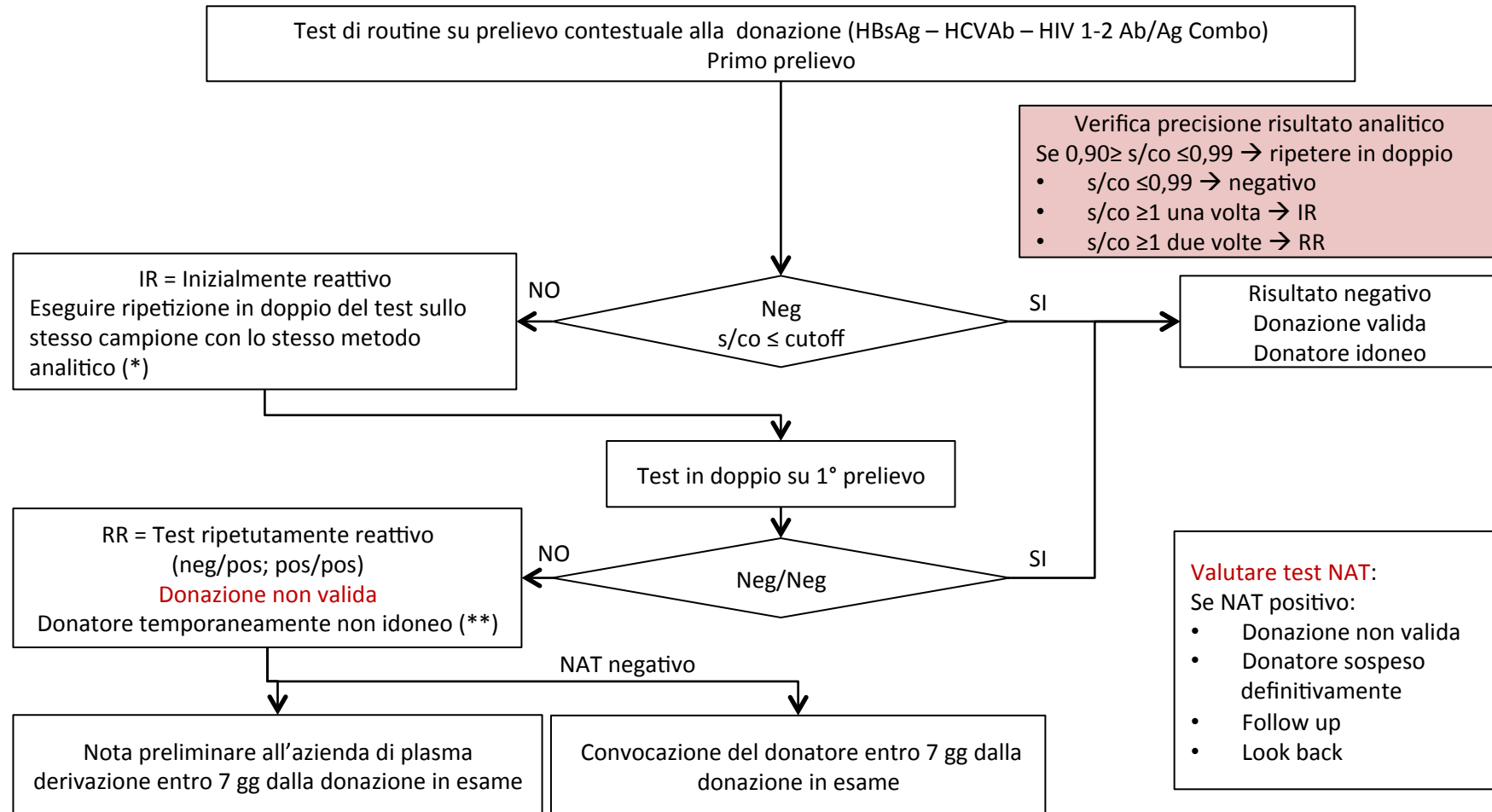
Tavolo tecnico validazione biologica emocomponenti

Esperienza di Lecco

Test	S/CO	N°	VIDAS POS	NAT	NOTE
HBsAg	0,70-0,99	29	0	0	
	1,00-50	64	9	0	
	>50	2	2	1	Aspirante vero positivo
HCV Ab	0,70-0,99	82	16	0	
	1,00-2,50	280	92	0	
	>2,50	85	61	0	
HIV Ab/Ag	0,70-0,99	13	0	0	
	1,00-10	48	3	0	
	>10	1	1	1	Aspirante vero positivo

- ❑ E' stata effettuata una indagine su 103700 donazioni di sangue e 66100 pazienti pervenuti tra Marzo 2014 e marzo 2016
- ❑ Sono state valutate tre fasce di reattività ai test di screening, espresse come s/co. E' stato ipotizzato un valore di PPV.

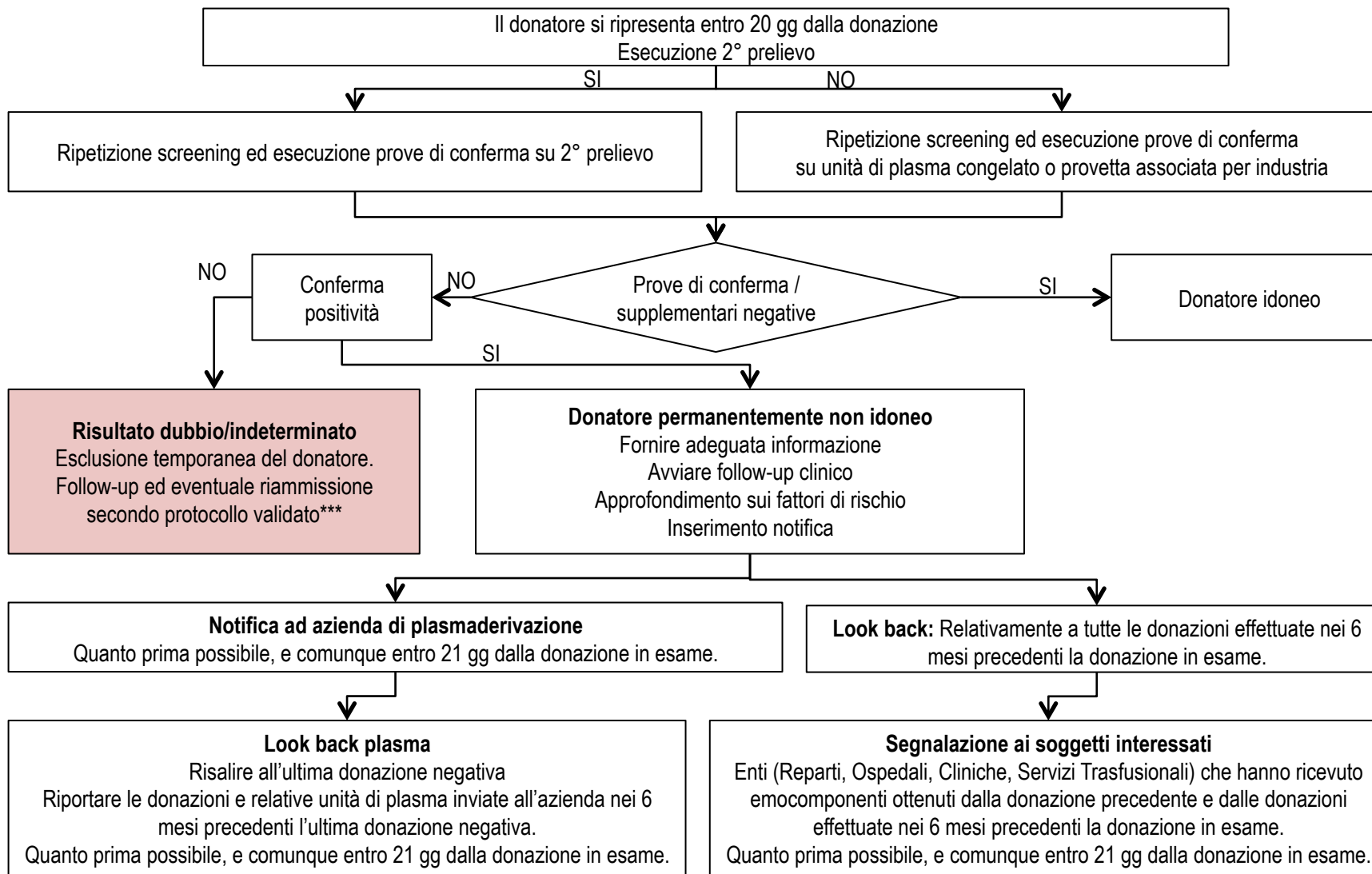
**Algoritmo diagnostico
in caso di test sierologico reattivo e test NAT negativo (1)**



(*) In caso di test inizialmente reattivo, i relativi emocomponenti vengono segregati e il donatore viene temporaneamente escluso in attesa della ripetizione dei test, da eseguire in doppio sullo stesso campione con lo stesso metodo analitico. (Primo riscontro)

(**) Eliminare emocomponenti cellulari. Segregare unità di plasma congelato, ove disponibile, per invio al laboratorio di qualificazione biologica che ha eseguito i test di screening, nel più breve tempo possibile e comunque entro 48 ore. Documentare l'operazione garantendo la registrazione. Ripetere il test RR su plasma scongelato, mediante 3 repliche, con lo stesso metodo e sistema analitico.

**Algoritmo diagnostico
in caso di test sierologico ripetutamente reattivo e test NAT negativo (2)**



***Se i test sierologici di conferma risultano negativi o indeterminati eseguire un secondo test sierologico con altro metodo analitico; se il secondo test sierologico ha esito negativo il donatore può essere riammesso secondo un protocollo validato (valutare l'opportunità di eseguire per le donazioni successive test di screening con metodo alternativo -**GU SG n.300 del 28-12-2015**); se il secondo test sierologico ha esito positivo il donatore è permanentemente escluso.

Sierodiagnosi di Sifilide

MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2008 Aug 15;57(32):872-5.

Syphilis testing algorithms using treponemal tests for initial screening--four laboratories, New York City, 2005-2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

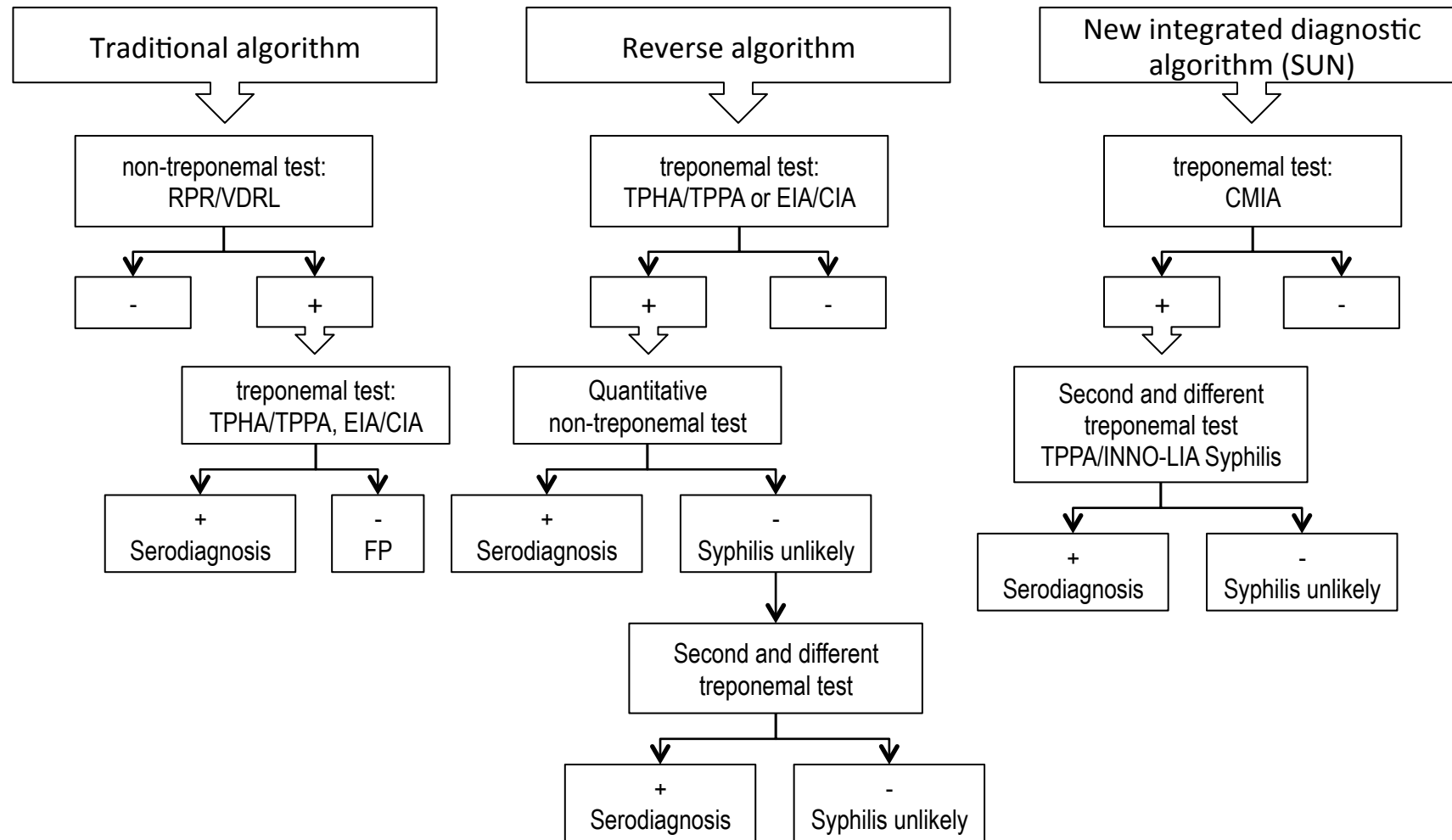
- ❑ Il tradizionale ordine di screening per la LUE è sempre consistito in un primo test non –treponemico ed in un secondo test di conferma treponemico.
- ❑ Nel 2006 il CDC prende atto della tendenza ad invertire l'ordine di indagine; primo test treponemico e secondo test di conferma non-treponemico. (Association of Public Health Laboratories; United Kingdom Health Protection Agency; International Union Against Sexually Transmitted Infections)
- ❑ Non ci sono linee guida e gold standard di riferimento

Analysis of 3 Algorithms for Syphilis Serodiagnosis and Implications for Clinical Management

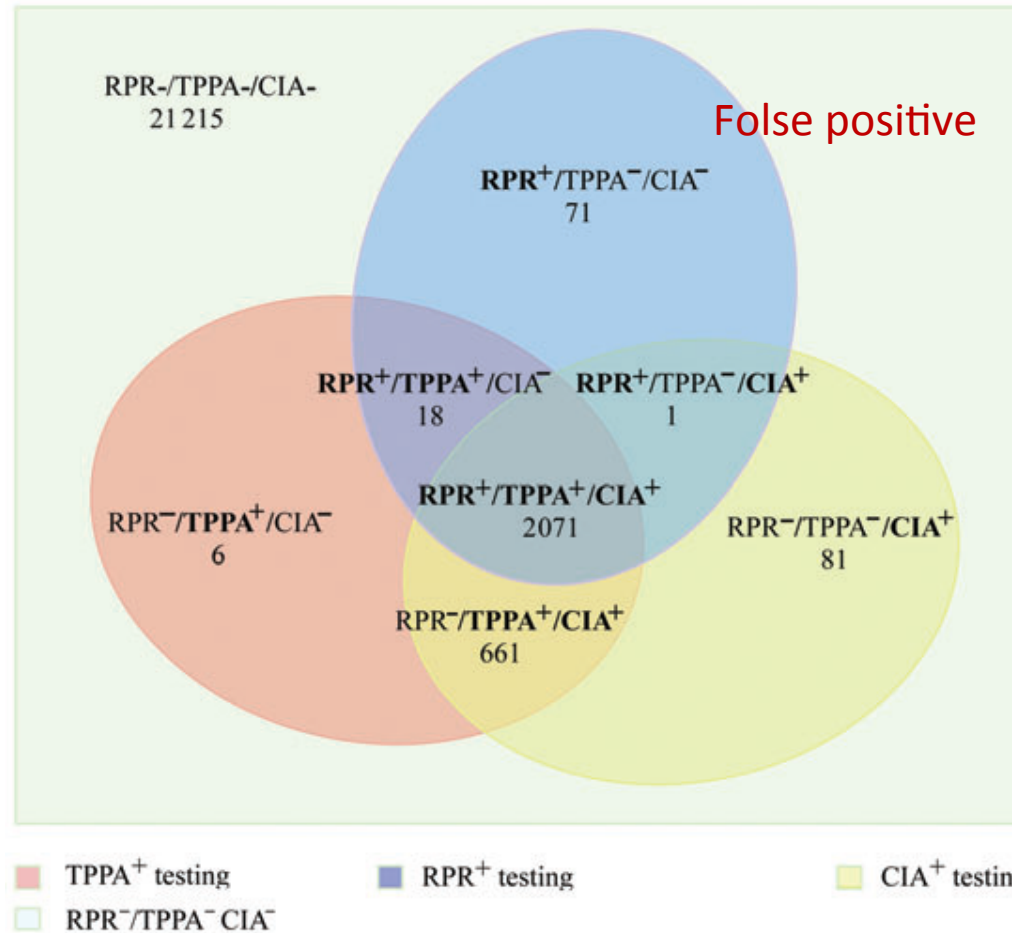
Man-Li Tong,^{1,a} Li-Rong Lin,^{1,2,a} Li-Li Liu,^{1,2,3,a} Hui-Lin Zhang,¹ Song-Jie Huang,¹ Yu-Yan Chen,¹ Xiao-Jing Guo,¹ Ya Xi,¹ Long Liu,⁴ Fu-Yi Chen,⁵ Ya-Feng Zhang,¹ Qiao Zhang,¹ and Tian-Ci Yang^{1,2,6}

¹Zhongshan Hospital, Medical College of Xiamen University, ²Xiamen Zhongshan Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, and ³Xiamen Zhongshan Hospital, Fujian Medical University, Xiamen, ⁴Department of Chemistry and Biology, College of Science, National University of Defense and Technology, Changsha, China; ⁵Department of Physiology and Neurobiology, University of Connecticut, Storrs; and ⁶Shenzhen Research Institute of Xiamen University, Shenzhen, China

The actual testing algorithms for diagnosis of syphilis



Analysis of 3 Algorithms for Syphilis Serodiagnosis and Implications for Clinical Management

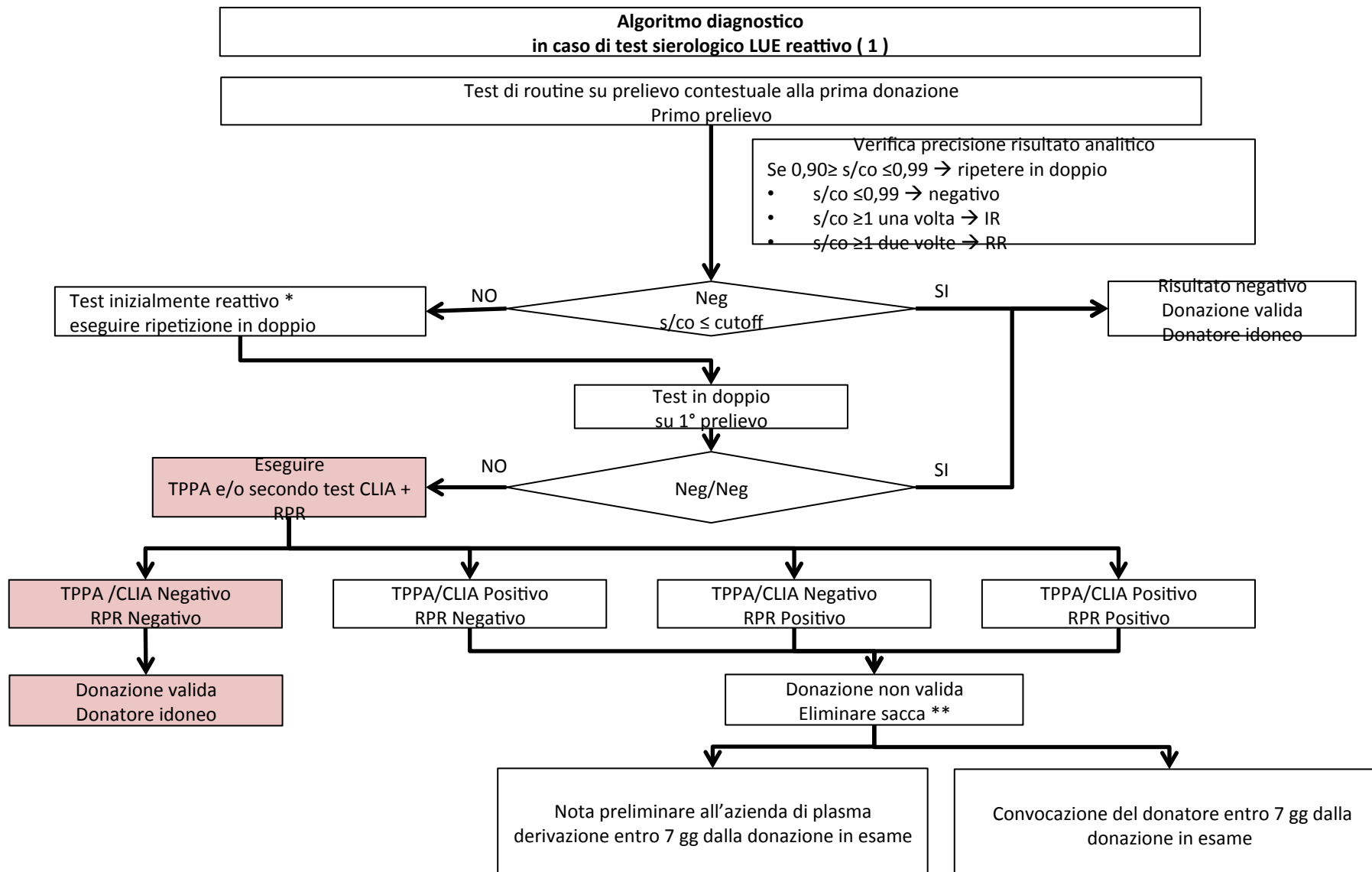


Abbreviations:
 CIA, chemiluminescence immunoassay;
 RPR, rapid plasma reagin;
 TPPA, Treponema pallidum particle agglutination

Serological results: 24124 subjects between december 2011 and May 2013

- 21215 Negative
- 2990 Positive

Tong ML et alri.Clin Infect Dis 2014;58:1116-24



(*) In caso di test inizialmente reattivo, i relativi emocomponenti vengono segregati e il donatore viene temporaneamente escluso in attesa della ripetizione dei test, da eseguire in doppio sullo stesso campione con lo stesso metodo analitico.

(**) Eliminare emocomponenti cellulari. Segregare unità di plasma congelato ove disponibile per invio al laboratorio di qualificazione biologica che ha eseguito i test di screening nel più breve tempo possibile e comunque entro 48 ore. Documentare l'operazione garantendo la registrazione tracciabile. Ripetere sul plasma scongelato, mediante 3 repliche, stesso metodo e sistema analitico.

**Algoritmo diagnostico
in caso di test sierologico LUE reattivo (2)**

Il donatore si ripresenta entro 20 gg dalla donazione
Esecuzione 2° prelievo

SI

NO

Esecuzione screening e prove di conferma su 2° prelievo

Esecuzione screening e prove di conferma su unità di plasma
congelato o provetta associata

NO

Conferma positività

NO

Prove di conferma:
profilo negativo
(Immunoblot - TPPA - RPR)

SI

Donatore idoneo

SI

Risultato dubbio/indeterminato
Esclusione temporanea del donatore. Follow-up ed
eventuale riammissione secondo protocollo validato

Donatore permanentemente non idoneo
Fornire adeguata informazione
Avviare follow-up clinico
Ulteriore approfondimento sui fattori di rischio
Inserimento notifica

Notifica ad azienda di plasmaderivazione
Quanto prima possibile, e comunque entro 21 gg dalla donazione in esame.

Look back
Relativamente a tutte le donazioni effettuate nei 6 mesi precedenti la donazione in esame.

Look back plasma
Risalire all'ultima donazione negativa
Riportare le donazioni e relative unità di plasma inviate all'azienda nei 6 mesi
precedenti l'ultima donazione negativa.
Quanto prima possibile, e comunque entro 21 gg dalla donazione in esame.

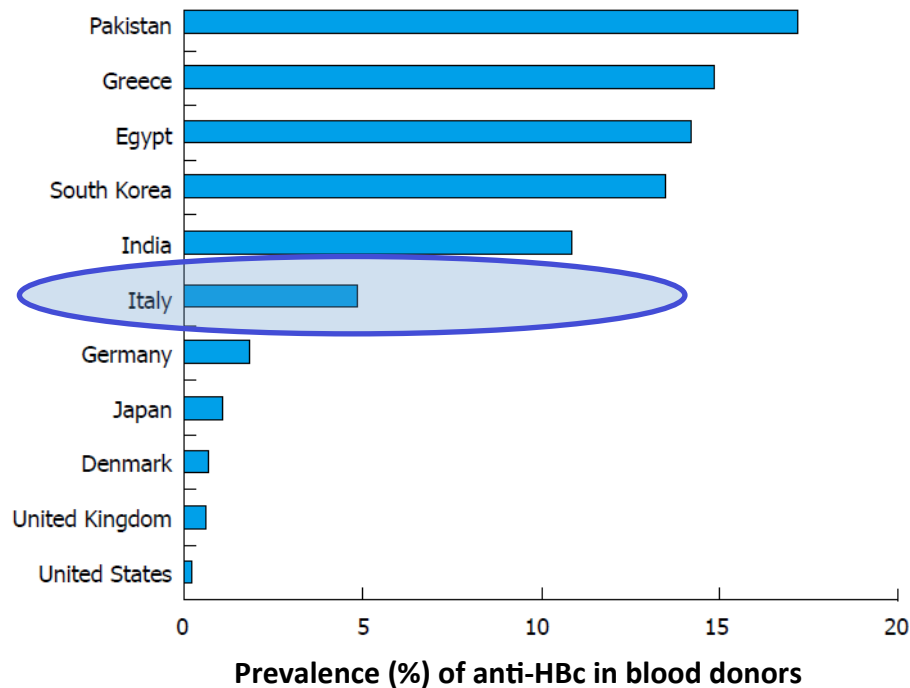
Segnalazione ai soggetti interessati
Enti (Reparti, Ospedali, Cliniche, Servizi Trasfusionali) che hanno ricevuto emocomponenti
ottenuti dalla donazione precedente e dalle donazioni effettuate nei 6 mesi precedenti la
donazione in esame.
Quanto prima possibile, e comunque entro 21 gg dalla donazione in esame.

Survey dei CLV Lombardi - NAT

- METODICA usata per i test di screening:
 - TMA: 3/8 (+CLV Brescia per WNV)
 - PCR: 5/8
- SISTEMA usato per i test di screening :
 - Grifols **Procleix** Ultrio Elite
 - Roche **Cobas**[®] TaqScreen MPX
- Metodologia usata per i test di screening:
 - TMA: ID NAT
 - PCR: MP da 6

HBV screening of blood units

- OBI can be transmitted by blood, and therefore HBV-DNA or anti-HBc are added to HBsAg screening of donations to prevent post-transfusion hepatitis



- In Italy, the frequency of anti-HBc blood donors is still relatively high (8-10%) [Romanò *et al.*, Blood Transfusion 2013])
- HBV DNA by NAT testing is adopted to avoid the exclusion of high numbers of blood donations
- Screening for anti-HBc is recommended in several countries in which the prevalence of hepatitis B is low, including Canada, France, Germany and the USA, in order to detect HBV-infected donors. (Romanò *et al.*, Blood Transfusion 2013]

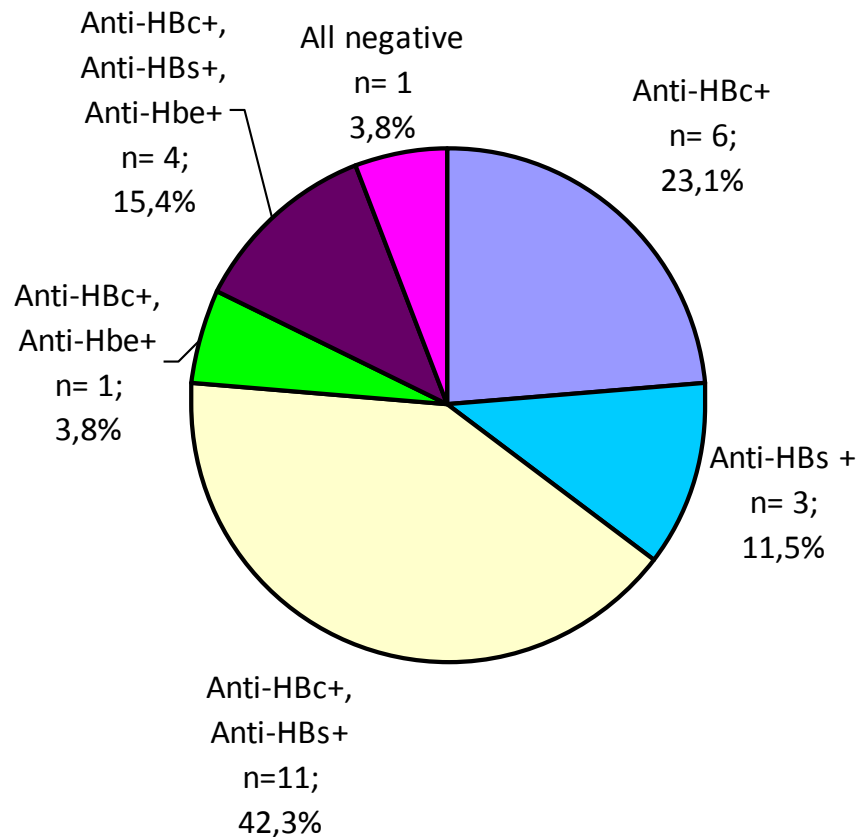
Criteria for hepatitis B virus screening and validation of blood components in Italy: the position of the SIMTI HBV working group

Claudio Velati¹, Laura Fomiatti¹, Lorella Baruffi¹, Vanessa Piccinini², Daniele Prati³, Anna Reina⁴, Andrea Lobbiani⁵, Alessandro Zanetti⁶, Luisa Romanò⁶ as SIMTI Working Group

- 43% of Italian transfusion centers perform anti-HBc test in addition to HBsAg and HBV DNA to select blood donors [*Velati C, Blood Transfusion 2011*]
- Italian guidelines (SIMTI 2011) recommended to **discontinue anti-HBc** [*Velati C, Blood Transfusion 2011*]
- This recommendation is mainly motivated by:
 - the need of avoiding the exclusion of large numbers of non infectious donations (HBV DNA in only 0.69% of anti-HBc positive/HBsAg negative subjects)
 - **the lack of evidence that, with current highly sensitive assays, HBV can be transmitted by anti-HBc positive, HBV DNA negative donations**

HOWEVER....

OBI donors in Lecco



- 88% OBI sono maschi
- Età media: 55 anni (range: 27–65 years) e livelli normali di ALT [median: 27 (11-31) U/L] e AST[median: 22 (15-30) U/L]

Anti-HBc positive donors: 74.6%

2014: Messa a punto di un algoritmo, basato su test di conferma sierologici e molecolari di approfondimento, per confermare i campioni IR-NAT e identificare gli OBI (LG CNS 04 del 20/06/2014)

Lookback study: 2 HBV TTI from donors with OBI

- Identificati **2 casi** di trasmissione del virus HBV in seguito alla trasfusione di unità negative allo screening NAT (6-MP) (entrambe anti-HBc pos)
- La trasmissione del virus HBV è stata confermata mediante analisi di sequenza e analisi filogenetica

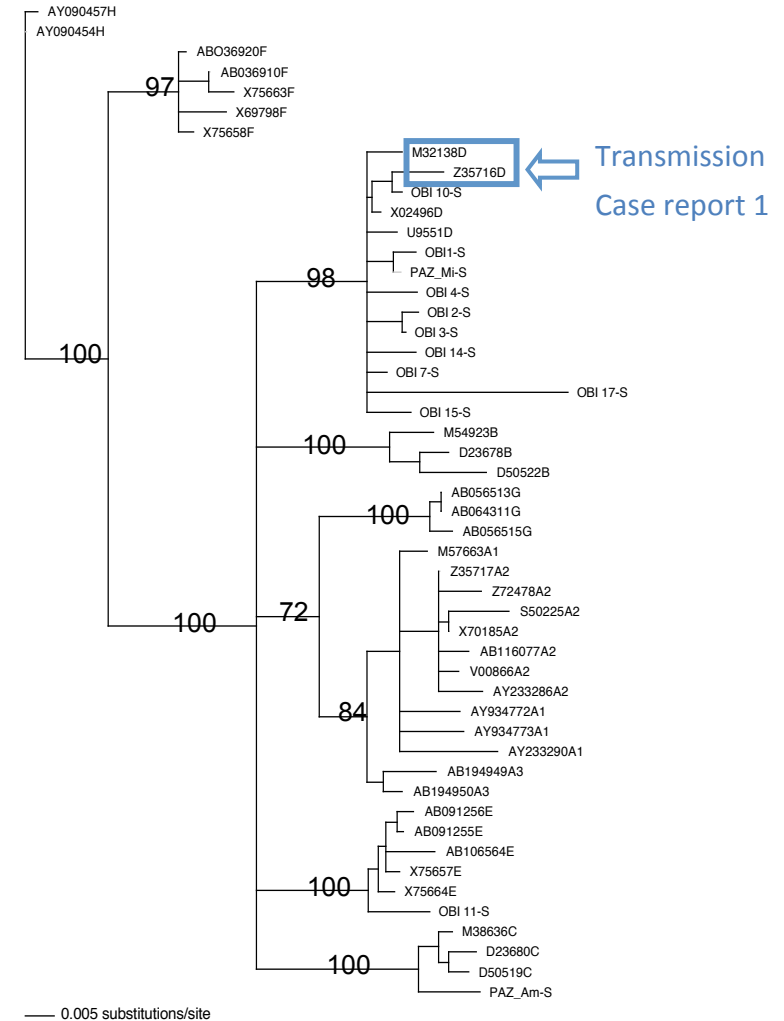
Case Report 1

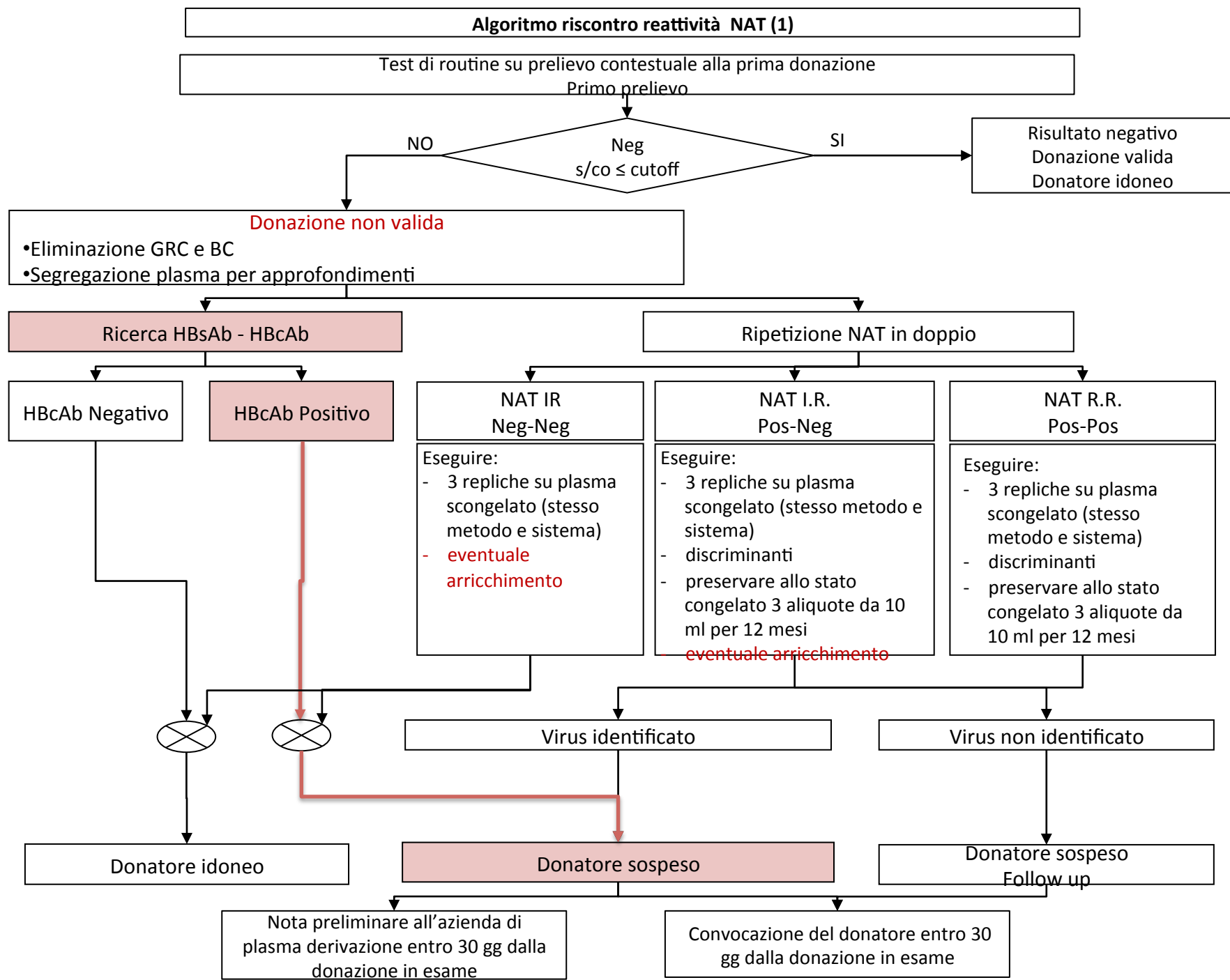
77 yr old female developed acute hepatitis B, 160 days after receiving a two red blood cell units transfusion

- Donors were previously found HBV DNA negative by using NAT-MP. One re-tested donor was identified OBI by ID NAT test
- Donor to patient transmission was documented by viral sequencing

Case Report 2

- 72 yr old female was subjected to severe long-term transfusion therapy . From January 2009 to February 2010 she received blood components from 473 different donors
- In March 2010 she received an allogenic bone-marrow transplantation, then did not require any other blood transfusion
- The patient, that in the meantime was HBV infected, had a fatal outcome for HBV reactivation after the immunosuppression therapy for bone marrow transplantation.

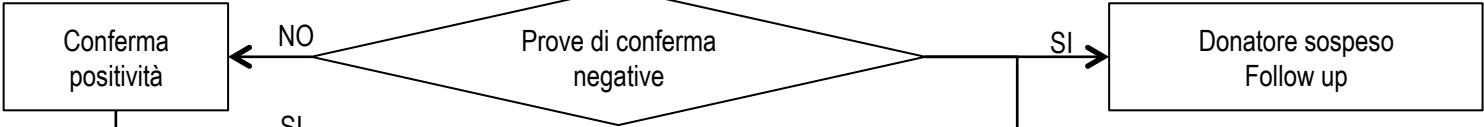




Algoritmo riscontro reattività NAT (2)

Esecuzione 2° prelievo

Esecuzione prove di conferma su 2° prelievo: **NAT in singolo, arricchimento del campione**



Donatore permanentemente non idoneo
Fornire adeguata informazione
Avviare follow-up clinico
Approfondimento sui fattori di rischio
Inserimento notifica

Virus già identificato al primo riscontro (es. OBI)

Notifica ad azienda di plasmaderivazione
Quanto prima possibile, e comunque entro 30 gg dalla donazione in esame.

Look back: Relativamente a tutte le donazioni effettuate nei 6 mesi precedenti la donazione in esame.

Look back plasma
Risalire all'ultima donazione negativa
Riportare le donazioni e relative unità di plasma inviate all'azienda nei 6 mesi precedenti l'ultima donazione negativa.
Quanto prima possibile, e comunque entro 30 gg dalla donazione in esame.

Segnalazione ai soggetti interessati
Enti (Reparti, Ospedali, Cliniche, Servizi Trasfusionali) che hanno ricevuto emocomponenti ottenuti dalla donazione precedente e dalle donazioni effettuate nei 6 mesi precedenti la donazione in esame.
Quanto prima possibile, e comunque entro 30 gg dalla donazione in esame.



➤ **Malattia di Chagas o tripanosomiasi americana**

- I soggetti nati (o con madre nata) in Paesi dove la malattia è endemica, o che sono stati trasfusi in tali Paesi, o che hanno viaggiato in aree a rischio (rurali) e soggiornato in condizioni ambientali favorevoli all'infezione (camping, trekking) ▶ **possono essere ammessi alla donazione solo in presenza di un test per anticorpi anti-Tripanosoma Cruzi negativo**

➤ **Malaria**

- soggetti che hanno vissuto per un periodo di 6 mesi o più (continuativi) in zona endemica in qualsiasi momento della loro vita;
- soggetti che hanno vissuto per un periodo di 6 mesi o più (continuativi) in zona endemica in qualsiasi momento della loro vita
- Tutti gli altri soggetti che hanno visitato un'area ad endemia malarica e che non hanno sofferto di episodi febbrili o di altra sintomatologia compatibile con la diagnosi di malaria durante il soggiorno o nei 6 mesi successivi al rientro
 - ▶ **devono essere sospesi dalle donazioni per almeno 6 mesi**
 - ▶ **possono essere accettati come donatori se risulta negativo un test immunologico per la ricerca di anticorpi antimalarici**

I test e i periodi di sospensione possono essere evitati in caso di donazione di solo plasma da avviare alla produzione industriale di farmaci emoderivati

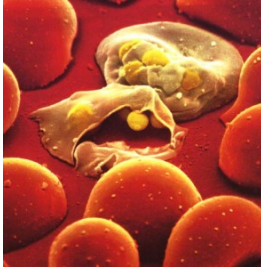
Il sangue non ha colore



La Donazione di Sangue nei Cittadini Stranieri: nuove opportunità di Prevenzione, Diagnosi, Cura e Integrazione Sociale

GRAZIE PER L'ATTENZIONE





MALARIA- Esperienza di Lecco

Periodo: 2012 – 2015

Provenienza	Endemia malaria	Totale	Positivi MALARIA Ab	% tot
AFRICA	SI	187	135	72%
AFRICA	NO	39	1	3%
AMERICA	-	72	1	1%
ASIA	-	37	2	5%
EU	-	138	3	2%
TOTALE individui	-	473	142	30%
TOTALE analisi	-	600	-	-

Interpretazione test:

<0,90 s/co NON REACTIVE

>1,00 s/co REACTIVE

0,80 < s/co < 1,00 GREY ZONE

MEDIA NEG s/co 0,16 - RANGE 0,00 - 0,80

MEDIA POS s/co 8,86 - RANGE 0,80 – 30 (out)

Provenienza	Endemia malaria	Totale	Positivi MALARIA Ab	% tot
AF Egitto	no	5	0	0%
AF Benin	si	16	14	88%
AF Burkina Faso	si	17	16	94%
AF Camerun	si	13	10	77%
AF Ciad	si	1	0	0%
AF Congo	si	1	1	100%
AF Costa d'Avorio	si	68	51	75%
AF Etiopia	si	3	0	0%
AF Ghana	si	2	2	100%
AF Madagascar	si	1	1	100%
AF Marocco	no	29	1	3%
AF Mali	si	1	1	100%
AF Ruanda	si	1	1	100%
AF Senegal	si	52	31	60%
AF Sierra Leone	si	1	1	100%
AF Togo	si	7	5	71%
AF Tunisia	no	5	0	0%
TOTALE		223	135	61%
TOTALE Paesi sub-sahariani		184	132	72%

CHAGAS - Esperienza di Lecco

Periodo: MAGGIO 2011 – MARZO 2016

Paese di origine	N test	N individui
Argentina	9	6
Bolivia	12	8
Brasile	19	18
Cile	1	1
Colombia	18	11
Cuba	2	2
Ecuador	20	17
El Salvador	3	3
Guatemala	4	4
Honduras	4	1
Messico	1	1
Perù	19	17
Repubblica Dominicana	2	2
Uruguay	4	3
Sri Lanka	1	1
Camerun	1	1
Italia	52	48
ND	7	7
TOT	179	152

Categoria	N test	N individui
donatori	137	113
aspiranti	36	32
pazienti	7	7
TOT	178	152

Interpretazione test:

<0,80 s/co NON REACTIVE

>1,00 s/co REACTIVE

0,80 < s/co < 1,00 GREY ZONE

MEDIA 0,055 s/co

RANGE 0,01 - 0,32

SD 0,055



TUTTI NEGATIVI !