

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

VICTORIA STADLER TASCA RIBEIRO

**COMPARAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DOS
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E HEPATITE C EM DOADOR
CADÁVER PARA ÓRGÃOS E TECIDOS**

CURITIBA

2019

VICTORIA STADLER TASCA RIBEIRO

**COMPARAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DOS
VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E HEPATITE C EM DOADOR
CADÁVER PARA ÓRGÃOS E TECIDOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Coorientadora: Dr^a. Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2019

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Luci Eduarda Wielganczuk – CRB – 9/1118

Ribeiro, Victoria Stadler Tasca
R484c Comparação de testes moleculares para identificação dos vírus da
2019 imunodeficiência humana e hepatite C em doador cadáver para órgãos e
tecidos / Victoria Stadler Tasca Ribeiro ; orientador: Felipe Francisco Bondan
Tuon ; coorientadora: Sonia Mara Raboni. – 2019.
74 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2019
Bibliografia: f. 53-66

1. Biologia molecular. 2. Hapacivirus. 3. HIV (Vírus). 4. Transplante de
órgãos. 5. Transplante de tecidos. I. Tuon, Felipe Francisco Bondan. II. Raboni,
Sonia Mara. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de
Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

CDD 22. ed. – 572.8633



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Escola de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL
DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos 16 dias do mês de agosto de 2019 às 14:00, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação "COMPARAÇÃO DE TESTES MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DOS VÍRUS DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA E HEPATITE C EM DOADOR CADÁVER PARA ÓRGÃOS E TECIDOS" apresentado por **Victoria Stadler Tasca Ribeiro** para obtenção do título de mestre; Área de concentração: Medicina e áreas afins.

A banca examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon – Presidente (PUCPR)	
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito (PUCPR)	
Prof. Dr. Luis Gustavo Morello (FioCruz)	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Profa. Dra. Selene Elifio Esposito
Prof. Dr. Luis Gustavo Morello

Conceito: Aprovada
Conceito: APROVADA
Conceito: APROVADO

Parecer Final: Aprovada

Observações da Banca Examinadora:

Prof. Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon
Presidente da Banca Examinadora

Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Prof.ª Dra. Cristina Pellegrino Baena
Coordenadora do PPGCS-PUCPR

“You look at science (or at least talk of it) as some sort of demoralizing invention of man, something apart from real life, and which must be cautiously guarded and kept separate from everyday existence. But science and everyday life cannot and should not be separated.”

Rosalind Franklin

AGRADECIMENTOS

Muito obrigada a vocês que enriqueceram a minha mente, que me incentivaram, acreditaram e sorriram para mim, pois as minhas alegrias também são suas e estão todas elas marcadas pelo estímulo, amor, carinho e compreensão que vocês me proporcionaram. Muito obrigada! Porque hoje eu encontro na minha conquista sincera e tranquila a presença de todos vocês.

À PUCPR, ao PPGCS e CNPq, pela oportunidade de estudo e concessão de bolsa.

À minha família, Berenice, Timoshenko, Neuza, Otone, Vera, Luiz Antônio, Tatiana, Wladimir, Paula, Juliana, Luísa e Rafael (e família) pelo apoio, pelas oportunidades, pela dedicação, pela paciência, pelo amor incondicional, pelo carinho, pela vida e por despertarem em mim a paixão pela ciência.

Ao meu orientador, Dr. Felipe Tuon, pela paciência e generosidade, por acreditar em mim, me conceder diversas oportunidades e diversos momentos de aprendizado.

À minha coorientadora, Dr^a. Sonia Raboni, por dividir brilhantes discussões.

Às minhas eternas chefes, Dr^a. Paula Hansen Suss e Dr^a. Luciana Wollmann, serei eternamente grata por depositarem em mim tanta confiança, por abrirem minha mente, acreditarem em meu esforço e por me incentivarem em inúmeros momentos.

Aos meus amigos do LEID – Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Letícia Kraft, Juliette Cieslinski Ana Paula Andrade, Carmen Ito, Larissa Bail, Lavínia Arend, Thamilly Lemos, Keite Nogueira e Guilherme Becker, companheiros de pesquisa, experimentos, discussões, aulas e aprendizados.

À Irenice Cairo e à Equipe do BTH – Banco de Tecidos Humanos, Adriane Silva, Danielle Pegoraro, Eunice Santos, Gisele Sonda, Leandro Souza, Mônica Pereira, Renata Ferreira, Roseli Nareski, Eva Mattos, Juliana Bortoli e Cassi Rodrigues por toda ajuda, paciência e dedicação.

À Equipe do Laboratório Genoprimer e do Biobanco - HC/UFPR, pela valiosa ajuda, paciência, cordialidade e disposição na realização desse trabalho.

À Gislene Kussen, pelo apoio e auxílio na realização desse trabalho nas dependências do HC-UFPR e setor de Bacteriologia.

Às colegas Jucélia Stadinicki dos Santos e Luciane Pereira, por seus trabalhos nas dependências do Laboratório de Virologia e Biobanco, pela ajuda e companheirismo.

Às amigas de faculdade Gabriela Dias, Izadora Oliveira e Paula Larocca, por dividirem o amor tão grande pela Biologia.

Aos amigos do Bom Jesus, pela garantia de um ombro amigo.

À Secretária do PPGCS, Paula Nascimento, pela atenção, cordialidade e agilidade em buscar soluções.

Às amigas Sandra Justino, Zilá Giacomini, Roseli Weber, Jane Coracini e Rita Sturza, grandes incentivadoras em diversas etapas da minha vida.

Aos Professores e Educadores pelas importantes lições, ensinamentos, valores e virtudes e por serem alicerces da minha formação.

À banca examinadora por aceitar o convite e pela sua valiosa avaliação.

“In the long history of humankind (and animal kind, too) those who learned to collaborate and improvise most effectively have prevailed.”
Charles Darwin

RESUMO

INTRODUÇÃO: As doações de órgãos e tecidos têm o potencial de salvar diversas vidas. Tecidos provenientes de doadores cadáver (DC) são utilizados em várias condições clínicas e a transmissão de doenças infecciosas já foi relatada. Análises de amostras de sangue de DC são um desafio devido à sua baixa qualidade. Apesar de alguns estudos já terem demonstrado a aplicação de métodos embasados em biologia molecular, a falta de estudos utilizando testes moleculares comerciais foi reportada. Ainda, no Brasil, é obrigatória a realização de testes moleculares em amostras de DC, entretanto, não há validação dessa metodologia. **OBJETIVO:** Avaliar a performance, especificidade, sensibilidade e acurácia de diferentes kits moleculares para detecção e quantificação de HIV e HCV em DC contaminadas artificialmente. **MÉTODOS:** 20 amostras de sangue provenientes de DC e 20 amostras de doadores de sangue foram aliquotadas e contaminadas artificialmente utilizando 1.000 cópias/mL e 1.000 UI/mL de padrões virais liofilizados de HIV e HCV, respectivamente. As alíquotas contaminadas, não contaminadas e seus respectivos controles internos foram analisados pelos kits XPERT HCV Viral Load e HIV-1 (Cepheid), COBAS® TaqMan® HIV-1 / HCV Test, v2.0 (Roche), artus® HI Virus-1 QS-RGQ e artus® HCV RG RT-PCR Kit (Qiagen). Foram avaliados os parâmetros de sensibilidade, especificidade e acurácia, além de correlação de resultados inválidos com qualidade das amostras e concordância entre os kits através do coeficiente de Cohen's kappa. **RESULTADOS:** HIV e HCV em amostras de DC foram detectados pelos kits quantitativos baseados em PCR. Os testes conduzidos pelos kits Cepheid e Roche demonstraram-se acurados, sensíveis e específicos, entretanto, uma grande variabilidade foi observada em todos os kits, principalmente em amostras de DC. Ambos os kits da Qiagen não apresentaram resultados satisfatórios em termos de acurácia, sensibilidade e especificidade. Não foi observada nenhuma correlação entre a qualidade das amostras de DC e resultados inválidos. Ainda, os kits de HIV e HCV das marcas Roche e Cepheid demonstraram boa concordância pelo coeficiente de Cohen's kappa. **CONCLUSÃO:** A avaliação das amostras de DC mostrou grande variabilidade. Kits da Cepheid e Roche foram mais sensíveis, acurados e específicos para detecção de HIV em DC, e o kit da Cepheid foi o mais eficiente para a quantificação e detecção de HCV em DC. Os kits da Roche e Cepheid podem ser aplicados para a triagem de HIV e HCV em doador cadáver. Em conjunto, os resultados apresentados, levando em consideração as limitações do estudo, sugerem que realizar testes moleculares em amostras de doador cadáver pode aumentar a segurança no transplante de órgãos e tecidos, evitando a liberação de resultados falso-negativos e evitando o descarte de órgãos e tecidos viáveis por resultados falso-positivos.

PALAVRAS-CHAVE: HIV; HCV; doador cadáver; banco de tecidos; biologia molecular

ABSTRACT

INTRODUCTION: The organs and tissue donations have the potential of saving several lives. Tissues from cadaveric donors (CD) are used in several clinical circumstances, and the transmission of infectious diseases has been reported. CD blood sample analysis is challenging due to its poor quality. Despite some studies have demonstrated the usefulness of molecular based methods, the lack of studies using available commercial molecular tests was reported. Moreover, in Brazil, it is mandatory to perform molecular tests on CD samples, however, there is no validation of this methodology. **PURPOSE:** To evaluate the performance, specificity, sensitivity, and accuracy of different commercial molecular tests for HIV and HCV detection and quantification in CD through artificial contamination of samples. **METHODS:** 20 CD and 20 blood donor samples were aliquoted and tested using 1,000 copies/mL and 1,000 IU/mL of lyophilized standards of HIV and HCV, respectively. The contaminated, non-contaminated and the respective kits intern controls were analyzed by XPERT HCV Viral Load and HIV-1 (Cepheid), COBAS® TaqMan® HIV-1 / HCV Test, v2.0 (Roche), and artus® HI Virus-1 QS-RGQ and artus® HCV RG RT-PCR Kit (Qiagen). Parameters such as sensitivity, specificity and accuracy were evaluated, and the correlation between the invalid results with the samples quality. Moreover, the concordance among the kits was calculated through Cohen's kappa coefficient. **RESULTS:** HIV and HCV in CD were detected by PCR-based quantitative kits. The tests performed by the Cepheid and the Roche kits showed accurate, sensitive and specific results, however, a wide variability between the assays and kits was observed, mainly in CD samples. Both Qiagen's kits did not demonstrate satisfactory results for accuracy, sensitivity and specificity. Any correlation was observed between the CD samples quality and the invalid results. In addition, the Roche and Cepheid HIV and HCV kits have demonstrated good agreement by Cohen's kappa coefficient. **CONCLUSION:** CD evaluation showed great variability. The Cepheid and Roche kits were more sensitive, accurate and specific for detecting HIV on CD and Cepheid was the most efficient kit for HCV quantification in CD. The Roche and Cepheid kits can be used to screen tissue donors for HIV and HCV. The presented results, considering the study limitations, suggest that performing molecular tests in CD samples can improve the safety on organ and tissue transplantation, avoiding the liberation of false-negative results and avoiding the discharge of viable organs and tissues due to false-positive results.

KEYWORDS: HIV; HCV; deceased donor; tissue bank; molecular biology

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Processing scheme of samples (of both groups – blood and cadaveric donors).*

Figura 2. *Boxplot indicating HIV (copies/mL) mean detection and SD among the brands for cadaveric and blood donor samples.*

Figura 3. *Boxplot indicating HCV (IU/mL) mean detection and SD among the brands for cadaveric and blood donor samples.*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: *Cadaveric blood samples' characteristics.*

Tabela 2: *Cohen's kappa coefficient (κ) between Cepheid, Roche and Qiagen results for HIV and HCV detection.*

Tabela 3: *Results of sensitivity, specificity and accuracy of each test of each brand, respectively.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDC	Centros de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
HBV	Vírus da Hepatite B (<i>Hepatitis B Virus</i>)
HCV	Vírus da Hepatite C (<i>Hepatitis C Virus</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HTLV I/II	Vírus linfotrópico da célula T humana (<i>Human T-Lymphotropic Virus</i>)
IU/mL	Unidades Internacionais por mililitro
NAT	Teste de Ácido Nucleico (<i>Nucleic Acid Test</i>)
NIBSC	Instituto Nacional de Padrões e Controles Biológicos (<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>)
OPTN	Rede de Obtenção e Transplante de Órgãos (<i>Organ Procurement and Transplantation Network</i>)
OPO's	Organizações de Obtenção de órgãos (<i>Organ Procurement Organizations</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ácido Ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	ÓRGÃOS E TECIDOS PROVENIENTES DE DODORES CADÁVER	14
1.2	TRIAGEM E SELEÇÃO DE DOADORES CADÁVER	15
1.3	INFECÇÕES VIRAIS POR HIV E HCV	18
1.4	CONTEXTUALIZAÇÃO E HISTÓRIA NATURAL DOS VÍRUS HIV E HCV	19
1.5	TESTES PARA DETECÇÃO DE HIV E HCV	22
2	JUSTIFICATIVA	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	METODOLOGIA	28
5	RESULTADOS	29
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8	ANEXOS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÓRGÃOS E TECIDOS PROVENIENTES DE DOADORES-CADÁVER

As doações de órgãos e tecidos têm o potencial de salvar diversas vidas. A nível mundial, os rins são os órgãos sólidos mais comumente transplantados, seguidos por fígado e coração. Ainda, córnea e enxertos musculoesqueléticos são os tecidos mais utilizados para transplante (SULANIA et al., 2016).

Tecidos e órgãos provenientes de doadores cadáver (DC) são a principal fonte para transplante, e são utilizados em diversas áreas clínicas, sendo os principais tecidos: musculoesqueléticos (ossos, cartilagem, tendões, ligamentos e fáscia), córneas e enxertos cardiovasculares (valvas aórticas e pulmonares, pericárdio, veias e artérias) (EDLER et al., 2011; WILKEMEYER et al., 2012; PADLEY et al., 2005), e buscam proporcionar melhora na qualidade de vida de pacientes, sendo assim uma importante fonte para tratamentos (MEYER et al., 2012). Além disso, os transplantes de órgãos podem reduzir os custos associados com os estágios finais da falência de algum órgão. Entretanto, o número de órgãos e tecidos disponíveis para transplante é limitado (ABOUNA, 2001). Estima-se que nenhum país no mundo consegue captar órgãos suficientes para atender às necessidades da população, cobrindo aproximadamente <10% da necessidade global (GARCIA et al., 2012).

Adicionalmente, em ritmo crescente, a necessidade de transplantar órgãos é conduzida por diferentes abordagens e métodos nos mais diferentes países, conforme a conduta das agências regulatórias de transplantes de cada país, e de maneira geral, são seguidas diretrizes propostas pela OPTN (*Organ Procurement and Transplantation Network*) e OPO's (*Organ Procurement Organizations*). Países como Espanha, Áustria, Croácia, Estados Unidos, Noruega, Portugal, Bélgica e França apresentam as maiores taxas de doações de órgãos provenientes de DC (GARCIA et al., 2012). Entretanto, cada instituição apresenta peculiaridades em suas funções, o que acarreta diferentes taxas de doação de órgãos, estando atreladas a diferenças estruturais, monetárias e culturais de cada região. Ainda, fatores como autópsia, diferenças na população de doadores, localização geográfica, manipulação das amostras, validação de testes internos, disponibilidade e variabilidade dos testes também estão atribuídos a essas diferentes taxas (KAZEMEYNI, 2009; GREENWALD et al., 2017).

1.2 TRIAGEM E SELEÇÃO DE DODADORES-CADÁVER

Os bancos de tecidos humanos têm como objetivo selecionar potenciais doadores, avaliar, triar, captar, processar, armazenar e disponibilizar tecidos para fins terapêuticos e/ou científicos. Ao redor do mundo são reportadas diversas abordagens pelas diferentes agências regulatórias a fim de avaliar testes buscando doenças infecciosas (GREENWALD et al., 2012; GROSSI et al., 2009; GUYOTAT, 1990; PRUSS, 2010; DA FONSECA VICTER et al., 2016).

No Brasil, para realizar captações de tecidos, as equipes de retirada devem estar cadastradas e autorizadas pela Central de Notificação, Captação e Distribuição de Órgãos e Tecidos dos Estados e Coordenação Geral do Sistema Nacional de Transplantes, conforme exigências legais. Os aspectos legais e éticos do processo da doação são conduzidos pelas Centrais de Transplantes dos Estados, baseados na legislação brasileira vigente pela RDC nº 55, de 11 de dezembro de 2015 e portaria 2600 do Ministério da Saúde (ANVISA, 2015; BRASIL, 2009).

Adicionalmente, a avaliação do potencial doador é feita por meio de triagem clínica, social, física e laboratorial, além de uma entrevista e questionário com responsáveis pelo curatelado a respeito do histórico de vida e hábitos; essas medidas têm como finalidade investigar a presença de antecedentes médicos e sociais que estabeleçam risco de transmissão de doenças infectocontagiosas ou doenças malignas para o receptor. Perante a RDC nº 55, de 11 de dezembro de 2015 (boas práticas em tecidos humanos para uso terapêutico) e a portaria nº2.600/GM de 21 de outubro de 2009, que estabelece o regulamento técnico do sistema nacional de transplantes, entre os critérios de seleção e exclusão de DC, a doação só pode ser efetivada seguindo os critérios técnicos estabelecidos. Portanto, doadores com causa da morte indefinida, sinais físicos que sugiram risco de doenças malignas ou sexualmente transmissíveis, infecção local não controlada no momento da doação, história de doença crônica, sistêmica e auto-imune capazes de prejudicar a qualidade dos tecidos a serem doados, exposição a agentes infecciosos em viagens, exposição a substâncias tóxicas nos últimos 12 meses, história de vacinação, testes laboratoriais anti-citomegalovírus (CMV) (IgG) e anti-Toxoplasma (IgG) reagentes. Ainda, indica-se a realização de testes laboratoriais específicos para o doador, que inclui sorologia para Vírus da Hepatite B (HBV), HCV, HIV, sífilis, Chagas, HTLV I/II (Vírus Linfotrópico T Humano tipos I e II) (ANVISA, 2015; BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

Além disso, recomenda-se que todos os doadores de tecidos sejam triados através de anti-HIV 1 e 2, anti-HBc, HBsAg e anti-HCV, utilizando testes sorológicos para doador de sangue licenciados pela ANVISA e também pelo teste de detecção de ácido nucleico para HIV (Vírus da Imunodeficiência Humana) e HCV (Vírus da Hepatite C). Destaca-se também que o tempo de coleta dos órgãos e ou tecidos de DC entre a parada cardiorrespiratória e retirada pode variar de 0 a 24 horas, a depender do que será captado e das condições de preservação do DC (ANVISA, 2015; BRASIL, 2008; BRASIL, 2009).

Entretanto, foram relatados casos de transmissão de doenças infecciosas em transplantes de órgãos e tecidos provenientes de doadores vivos e cadáver, tais como HIV, HCV, HBV, Raiva, doença priônica e Dengue (EASTLUND, 1995; TOMFORD, 1995; CONRAD et al., 1995; FISHMAN et al., 2012; ISON et al., 2011; BIXLER et al, 2019; ROSSO et al., 2018; GUPTA et al., 2016; CHEN et al., 2017; SURYAPRASAD et al., 2015; NAM et al., 2018). Adicionalmente, foi relatada transmissão de doenças virais na realização de transplantes em situações onde houve falha de comunicação interna, em outra ocasião não foram realizados exames sorológicos adicionais antecedendo a doação, e pela falta de realização de NAT (*Nucleic Acid Test* - Teste de Ácidos Nucleicos) (BELLANDI et al., 2010; ISON et al., 2012; ISON et al., 2011). Ainda, Ball e colaboradores (1991) constaram em seu trabalho que os vírus conseguem sobreviver em tecidos preservados em condições laboratoriais por várias horas após a morte de um indivíduo.

Para tanto, se faz necessária a realização de testes para marcadores de doenças em doadores com o intuito de minimizar a transmissão de doenças (EASTLUND, 2000). A liberação dos tecidos musculoesqueléticos, cardíacos e de córnea para uso terapêutico só é feita após a revisão das informações contidas no relatório de captação, no histórico médico e social, no exame físico, no termo de autorização de remoção de órgãos e tecidos, nos exames sorológicos e nos testes laboratoriais.

Além disso, a OPTN (Rede de Obtenção de Órgãos – *Organ Procurement and Transplantation Network*) ordena que, no mínimo, doadores de órgão sejam triados para infecções ativas e latentes, através de cultura bacteriana do sangue, urina e escarro. Testes para antígeno e anticorpo de HIV 1 e 2, anticorpo para sífilis, anticorpo para citomegalovírus, anticorpo para o vírus Epstein-Barr, anticorpo nuclear de hepatite B, antígeno de superfície de hepatite B e anticorpo de HCV.

Adicionalmente, a OPTN exige que testes sorológicos sejam validados para plasma e soro de DC (OPTN, 2013; THEODOROPOULOS, 2013).

1.3 INFECÇÕES VIRAIS POR HIV E HCV

Estima-se que 71 milhões de pessoas ao redor do mundo convivem com HCV (WHO, 2017) e outros 36,7 milhões estão infectadas com HIV (UNIAIDS, 2016). O número de pessoas que apresentam quadros de coinfecção chegam 2,3 milhões a nível global (PLATT et al., 2016).

No Brasil, de 2007 até junho de 2018, foram notificados no SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) 247.795 casos de infecção pelo HIV, sendo 117.415 (47,4%) na região Sudeste, 50.890 (20,5%) na região Sul, 42.215 (17,0%) na região Nordeste, 19.781 (8,0%) na região Norte e 17.494 (7,1%) na região Centro-Oeste (BRASIL, 2018). Ainda, segundo dados do Ministério da Saúde, (2018), entre 2007 e 2017, 9,4% do total de casos notificados de HCV apresentaram coinfecção com HIV.

De 1999 a 2017, foram notificados no Brasil 331.855 casos de hepatite C com um dos marcadores – anti-HCV ou HCV-RNA – reagente. Adicionalmente, a hepatite C representa 75,8% dos óbitos por causa básica e associada às hepatites virais segundo o agente etiológico no Brasil entre 2000 a 2016, e representa a terceira maior causa de transplantes hepáticos (BRASIL, 2018).

Mesmo que as transmissões de doenças possam ocorrer em menos de 1% dos receptores de órgãos (ISON, 2009; ISON, 2011), testes altamente sensíveis para HIV e HCV são essenciais para minimizar e mitigar o risco de transmissão de doenças (EASTLUND, 2005), visto que quando ocorrem, as transmissões de vírus geralmente causam acometimentos graves e morte dos receptores de órgãos (GASINK et al., 2006; FABRIZI et al., 2014; CARBONE et al., 2013).

1.4 CONTEXTUALIZAÇÃO E HISTÓRIA NATURAL DOS VÍRUS HIV E HCV

O HIV caracteriza-se por ser um vírus pertencente à família Retroviridae do gênero Lentivirus (VAISHNAY et al., 1991; CAMPBELL & ROBINSON, 1998). Apresenta longo período de incubação, e ao entrar na célula-alvo, o genoma de RNA viral é convertido em DNA de cadeia dupla pela transcriptase reversa (SMITH & DANIEL, 2006). O HIV é composto por duas cópias de RNA de cadeia única e senso positivo com aproximadamente 9749 nucleotídeos. O espectro clínico da infecção pelo HIV inclui infecção primária (aguda), infecção assintomática (latente), sintomas iniciais da infecção e imunodeficiência avançada com complicações oportunistas (MANDELL, DOUGLAS & BENNET, 2009).

A infecção pelo HIV-1 mostra um amplo espectro de apresentações clínicas, e em indivíduos não tratados, estima-se que o tempo médio entre o contágio e o aparecimento da doença esteja em torno de dez anos. Neste momento, bilhões de partículas virais se amplificam diariamente, onde apresentam elevada viremia plasmática e tem característica de serem altamente infectante. Observa-se um período de latência e fase sintomática, cujo período pode variar de indivíduo para indivíduo. Costumeiramente o exame físico do paciente é normal, entretanto, sintomas como linfadenopatia generalizada é frequente. A contagem de linfócitos T-CD4+ apresenta-se normal, porém são relatados episódios de infecções bacterianas. Com a progressão da doença, sintomas constitucionais são observados. Nesse período, já é possível encontrar diminuição na contagem de linfócitos T-CD4+ (FAUCI et al., 1996; BRASIL, 2013; BACHETTI, 1989).

O aparecimento de infecções oportunistas e neoplasias é o que define de fato a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Esses sintomas podem ocorrer até o acometimento total do paciente (DAAR, LITTLE & PITT, 2001; PEDERSEN et al., 1989; POLK et al., 1987).

A nível mundial, a infecção pelo HIV é predominantemente transmitida via sexual, também pela transmissão vertical durante a gravidez (mãe para o feto), amamentação e compartilhamento de agulhas. Ainda, transfusões com sangue contaminado com HIV continuam sendo fontes de infecção em algumas partes em desenvolvimento do mundo em consequência da falta de implementação de políticas nacionais de transfusão, o recrutamento de doadores voluntários, a falta de triagem apropriada do sangue coletado (TAGNY et al., 2008). Transmissões de HIV por compartilhamento seringas e agulhas não estéreis ainda ocorrem, mas a sua taxa de

transmissão em países em desenvolvimento não é bem documentada (PRESTERL et al., 2019).

A transmissão dos vírus pelo sangue e outros tecidos pode ocorrer em casos em que os receptores de sangue ou de produtos sanguíneos não testados de doadores infectados pelo HIV estão sob alto risco de infecção pelo HIV, sendo reportada a transmissão de HIV através do recebimento de sangue total, componentes celulares do sangue, plasma e outros hemoderivados em vários estudos (CURRAN et al., 1984; EVATT et al., 1984; PRESTERL et al., 2019; CAPPY et al., 2019). A detecção do HIV é reportada por diferentes métodos, podendo ser detectado em diferentes condições, isto é, em doador vivo ou DC com diferentes cargas virais (GREENWALD et al., 2017).

Uma redução adicional no risco de HIV transmitido por transfusão nos Estados Unidos ocorreu depois que a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a implementação do teste NAT de unidades de sangue em 2002, o que reduz o período de janela para aproximadamente 12 dias. Em um ensaio clínico, um total de 7 doações positivas para o HIV-1 e 88 do vírus da HCV que de outra forma não teriam sido diagnosticadas foram detectadas em mais de 20 milhões de doações testadas (EUA, 2002; EUA, 2017).

Apesar disso, é importante destacar que a transmissão do HIV através de transplante de fígado, coração rim, pâncreas, ossos e pele foram reportadas no passado, e atualmente devido ao avanço da triagem, a transmissão do HIV é um evento raro (ERICE et al., 1991; CLARKE, 1987; SIMONDS et al., 1992, NAM et al., 2018, ISON et al., 2011).

O HCV é um vírus RNA da família Flaviviridae, que se espalha predominantemente por vias parenterais. Tem um genoma de 9379 pares de bases (MANDELL, DOUGLAS & BENNET, 2009). A transmissão do HCV requer que os viriões infecciosos entrem em contato com as células suscetíveis que são permissivas à replicação. Os sintomas clínicos assemelham-se aos de outras formas de hepatite viral, e a doença pode ser distinguida apenas por testes sorológicos. Menos de 15% a 25% dos casos de infecção aguda pelo HCV resultam no desenvolvimento de icterícia e, portanto, há uma alta taxa de infecção subclínica (HUANG et al., 2005).

O RNA do HCV pode ser detectado no sangue (soro e plasma), saliva, lágrimas, fluido seminal, líquido ascítico e líquido cefalorraquidiano (FIORE et al.,

1995; MENDEL et al., 1997; WANG et al., 1992), podendo ser detectado em baixas cargas virais e condições, dependendo do método. A transmissão do vírus pode ser por via percutânea, produtos sanguíneos contaminado, infecções nosocomiais, transmissão sexual, vertical e por transplante de órgãos e tecidos (BLANCHETTE et al., 1994; KINOSHITA et al., 1993; PRESTERL et al., 2019; THOMPSON et al., 2009; HEIKENS et al., 2019; TAVOSCHI et al., 2019; GREENWALD et al., 2017).

Após a infecção pelo HCV, o RNA do HCV torna-se detectável no soro dentro de alguns dias a 8 semanas (WITHERELL & BEINEKE, 2001). Geralmente está presente no sangue antes do desenvolvimento da icterícia, mas a carga de RNA viral pode flutuar muito, e alguns pacientes podem ser intermitentemente negativos para o RNA do HCV. O intervalo mínimo após suspeita de exposição, após o qual um teste de PCR do HCV persistentemente negativo exclui a infecção, não foi definitivamente estabelecido. Os testes ELISA anti-HCV tornam-se positivos após 8 semanas depois da exposição. Aproximadamente metade dos pacientes com infecção aguda sintomática têm anticorpos detectáveis para o HCV, no entanto, o desenvolvimento de anticorpos contra o HCV pode ser retardado em pacientes com infecção subclínica.

As aminotransaminases séricas tornam-se elevadas aproximadamente 6 a 12 semanas após a exposição e têm concentração variável. A distinção do HCV agudo de uma infecção crônica pelo HCV recém-descoberta pode nem sempre ser possível, pois o RNA do HCV e os anticorpos anti-HCV estão presentes em ambas as situações (CHANG et al., 1994).

Um histórico de exposição recente, um teste de anticorpos negativo com um RNA de HCV positivo, a presença de sintomas sugestivos de hepatite aguda e o nível de aminotransaminases séricas podem fornecer alguma ajuda. Devido à ausência de sintomas associados à infecção aguda e à alta propensão ao desenvolvimento de doenças crônicas, o HCV pode persistir de maneira indolente e silenciosa e surgir décadas mais tarde com manifestações de doença hepática terminal. Como resultado, a triagem periódica para infecção pode ser justificada em pacientes com alto risco de infecção (CHANG et al., 1994).

1.5 TESTES PARA DETECÇÃO DE HIV E HCV

O primeiro relato de AIDS associado à transfusão foi em 1982. Em 1983, os bancos de sangue iniciaram a auto exclusão voluntária de doadores com riscos de infecção pelo HIV. Em 1985, os primeiros testes sorológicos para o anticorpo de HIV tornaram-se disponíveis, e o uso desses testes sorológicos para HIV a fim de rastrear e triar as doações de sangue diminuiu drasticamente o risco de transmissão de HIV por transfusão de sangue (PETERMAN et al., 1987; LACKRITZ et al., 1995).

A identificação sorológica de doadores repetidos com infecção por HIV (incluindo a detecção de antígeno p24 e teste de ácido nucléico), triagem de sangue para HCV e HTLV I/II, e redução no número de transfusões realizadas também diminuíram o risco de transmissão viral (LACKRITZ et al., 1995; SCHREIBER et al., 1996; DODD, NOTARI & STRAMER, 2002; EUA, 2017). Doadores de órgãos e tecidos devem ser avaliados e rastreados por testes sorológicos de maneira semelhante aos doadores de sangue (EUA, 1988; EUA, 1988).

Diversos testes podem ser executados em doadores de tecidos com o propósito de diagnosticar HIV e/ou HCV, incluindo testes de anticorpos, antígenos, NAT e outros testes moleculares (MEYER, 2012; PRUSS, 2010; DELMONICO, 2000; GREENWALD, 2018; GUBBE, 2012) e dentre eles, o NAT e outros métodos moleculares podem detectar esses vírus antes dos outros testes, funcionando como testes complementares (PRUSS, 2010; DA FONSECA VICTER, 2016; DODD, 2009; KOPPELMAN, 2012; VERMEULEN, 2009; KLAUS, 2011). O NAT pode ser positivo entre 5,6 a 10,2 dias após a infecção/exposição, o que reduz a janela imunológica em aproximadamente 12 dias quando comparado ao teste sorológico de HIV (22 dias). Logo, sugere-se a utilização de NAT a fim de transpassar os riscos da janela imunológica. Adicionalmente, a triagem utilizando NAT pode ser benéfica ao detectar doadores falso positivos (<1%) quando um doador não é identificado como usuário de terapia antirretroviral e com supressão viral (KUCIRKA et al., 2011; FISHMAN & GROSSI, 2014; THEODOROPOULOS et al., 2018)

Também é relatado que técnicas utilizando métodos sorológicos podem falhar ao testar amostras de soro ou plasma de baixa qualidade provenientes de DC, podendo gerar resultados discordantes juntamente à variável do tempo de parada cardíaca de cada doador (HEIM et al., 1999). É relatado que amostras provenientes de DC podem ter tanto resultados falso-negativos quanto falso-positivos, levando ao descarte de tecidos aplicáveis para terapia (DOW, 2000).

Além das sorologias, é exigida a realização de teste de biologia molecular por meio de NAT através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o diagnóstico de HIV e HCV para os doadores de tecidos cardiovasculares e osteomusculares, visto que entre os eventos adversos do transplante de tecido cadavérico, a transmissão de vírus transmitidos pelo sangue (HIV, HCV e HBV) representa uma complicação importante (MEYER et al., 2012).

A triagem realizada por NAT permite detectar os vírus em fase de infecção aguda e, assim, podem reduzir o risco de transmissão de HIV, HBV e HCV aos doadores. Como o NAT detecta diretamente material genético viral, o tempo para o diagnóstico no período da janela imunológica (período entre o momento da infecção até o teste ser capaz de detectar o vírus) é substancialmente reduzido com este teste, quando comparado aos testes sorológicos, que necessitam de maior tempo pois detectam a formação de anticorpos (KUCIRKA et al., 2011; KLEINMAN et al., 2009; FIEBIG et al., 2003). Isso acrescenta mais segurança aos tecidos utilizados para transplante (MUELLER et al., 2012; SCHMIDT et al., 2010; KOPPELMAN et al., 2012; VERMEULEN et al., 2009). O uso de técnicas embasadas em PCR tem se mostrado amplamente aplicável para a detecção de vírus como o HIV e o HCV (CHURCHILL, 2016; BUSTIN, 2005, LI & LO, 2015).

Técnicas moleculares atualizaram o diagnóstico de doenças infecciosas, particularmente o diagnóstico de doenças virais, e testes moleculares quantitativos estão sendo avaliados e validados com baixas cargas virais (≤ 1.000 cópias/mL ou IU/mL) de HIV e HCV usando padrões virais liofilizados fornecidos pelo NIBSC, porém, eles estão focados em doadores vivos de sangue (AMENDOLA et al., 2014; WIESMANN et al., 2015; BRAUN et al., 2017). Ainda, métodos moleculares quantitativos demonstraram um menor *turnaround time* (tempo de detecção) quando utilizado 1.000 cópias ou UI/mL. (PRONIER et al., 2018; SENECHAL, 2012; NOLTE, 1999).

Greenwald e colaboradores (2018) realizaram um estudo comparando diferentes kits de antígeno, anticorpo e NAT para os vírus HIV, HCV e HBV com amostras de DC com histórico de contaminação por pelo menos um desses vírus. Foi constatado que para indivíduos com HIV, 97,9% deles tiveram teste de anticorpo reagente, enquanto 50,0% tiveram NAT positivo, e ao unir as duas metodologias, 98,1% tiveram resultado positivo. Para HBV, 94,4% dos DC apresentaram anti-HBc positivo e 25% apresentaram reatividade para antígeno de superfície e 19,2%

apresentaram NAT positivo, entretanto, ao unificar os exames, 97,5% dos indivíduos tiveram pelo menos uma metodologia reagente. Para HCV, 93,8% dos DC tiveram o teste de anticorpo positivo, enquanto 78,0% deles apresentaram NAT positivo, entretanto 96,9% foram reagentes quando somadas as metodologias.

Entretanto, a análise de amostras provenientes de DC são ímpares, pois contam com a presença de inibidores de reação de PCR como de testes sorológicos, que podem atrapalhar a interpretação e/ou qualidade dos resultados destes exames devido a fenômenos naturais que ocorrem após a morte, como hemólise (aumenta devido à parada cardiorrespiratória), hemodiluição, proteólise, autólise, inibidores, transfusões de sangue pré-morte, inibição por produtos de lise de células sanguíneas, degradação de ácidos nucleicos virais e interferência com contaminações bacterianas (presença de DNase e RNase de origem bacteriana). Estas condições podem levar a resultados falso-negativos, interferência na detecção do ácido nucleico viral ou mesmo reduzir a sensibilidade analítica dos sistemas de NAT. O mecanismo de interferência devido à hemólise é caracterizado como não sendo somente da hemoglobina, mas também dos outros constituintes intracelulares, que são liberados no soro ou plasma durante o processo de hemólise. Um procedimento de extração eficiente, entretanto, é essencial para a performance de sistemas de NAT (EDLER et al., 2011; GUBBE et al., 2012; BURTONBOY et al., 1996; MIÉDOUGÉ et al., 2002; PRUSS et al., 2010).

Alguns estudos sugerem que amostras para testes sorológicos são seguras com coletas até 48h após a parada cardíaca do doador, enquanto para NAT e outros testes moleculares, recomenda-se que as coletas sejam realizadas em até 24h (EDLER et al., 2011; PRUSS et al., 2010), mas já foi demonstrado que amostras coletadas de 36 a 48h após a morte também foi possível detectar com segurança cargas virais elevadas (MEYER, et al., 2012). Porém, há um grande perigo de contaminação bacteriana em amostras coletadas >24h *post mortem* (PRUSS et al., 2010).

Ainda, é importante destacar que ao testar amostras provenientes de DC é requerido um teste individualizado, e não em forma de *pool*, pois as amostras podem ser comprometidas (DA FONSECA VICTER, 2016).

2 JUSTIFICATIVA

Nos Estados Unidos, foi reportada a transmissão de HIV e HCV para quatro receptores após transplante de órgãos provenientes de um doador infectado, porém seu exame sorológico foi não reagente (ISON et al., 2011). Desde então, a otimização da triagem de doadores vem sendo requerida mundialmente (ISON et al., 2011; LAI et al., 2013; LEN et al., 2012). Ainda, os órgãos responsáveis pela captação realizam uma entrevista buscando o histórico de saúde de cada DC, porém existe um problema nessa abordagem devido a disponibilidade de informação que os entrevistados podem fornecer, e que podem não estar cientes de um histórico recente de riscos (EDLER et al., 2011).

Atualmente, a metodologia NAT é obrigatória para a triagem de doadores de sangue e doadores cadáver em vários países, inclusive no Brasil. Estudos comparativos feitos em diversos países, como Estados Unidos, Alemanha e Itália, demonstram redução da janela imunológica de detecção do vírus HIV de 16-20 dias nos testes sorológicos para 10-12 dias utilizando NAT, e de 70 para 10 dias para o vírus HCV (GALLARDA & DRAGON, 2000; NÜBLING et al., 2009; VELATI et al., 2008). Em outro estudo, foi demonstrado que a janela imunológica entre o período de exposição até a detecção no soro ou plasma utilizando NAT foi de 3 a 5 dias para HCV e 5 a 6 dias (HUMAR et al., 2010).

Entretanto, até agora, a maioria dos kits NAT comerciais não são licenciados para amostras de sangue pós-morte e, por isso, devem ser validados para esta finalidade. Adicionalmente, estudos prospectivos sobre o comportamento de parâmetros infecciosos para HIV e HCV em condições pós-morte são escassos (EDLER et al., 2011; GUBBE et al., 2012; MEYER et al., 2012; DA FONSECA VICTER et al., 2016).

Para os doadores de tecidos cardiovasculares ou osteomusculares, o NAT somente está validado para doadores vivos que evoluíram para morte encefálica. Por outro lado, parte dos doadores destes tecidos pode ser cadáver, isso é, uma doação já com coração parado, e usualmente, apenas o sangue *post mortem* pode ser coletado em circunstâncias definidas. Nestes casos, a captação em geral é realizada dentro de 12 a 15 horas quando o corpo fica em temperatura ambiente ou em até 24 horas quando refrigerado. Tecidos podem ser recuperados de DC, porém, o grande desafio é que o sangue, plasma e soro pós-morte é de baixa qualidade, sendo modificado por hemólise, hemodiluição, autólise e crescimento bacteriano

devido translocação depois da circulação ter cessado, fatores esses que podem interferir nos resultados de testes imunológicos/sorologias (GESSONI et al., 2004; KLAUS et al., 2011; EASTLUND, 2000).

Alguns kits de sorologia já foram validados para amostras de cadáver, entretanto, poucos kits comerciais de NAT foram estudados com esta finalidade. Ainda, no Brasil, os kits NAT utilizados atualmente para DC não se encontram validados para esse tipo de amostra, apesar de ser um exame mandatório pela legislação brasileira de transplantes. O kit NAT desenvolvido no Brasil pela Bio-Manguinhos® kit NAT HIV/HBV/HCV® é usado de rotina de triagem nos bancos de sangue (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil), entretanto a bula não especifica a validação para amostras provenientes de DC. Estas considerações justificam a necessidade de um estudo que valide os testes disponíveis no Brasil para este fim, isto é, em amostras de DC.

Ao detectar o RNA ou DNA do próprio vírus, o NAT pode identificar infecções virais em níveis mais baixos do que os imuno-ensaios detectam. O NAT pode ajudar a tornar o fornecimento de sangue mais seguro para doação de órgãos e tecidos como um teste complementar. Porém, apesar de alguns estudos já terem demonstrado a empregabilidade de NAT e outros testes moleculares em amostras de sangue de doadores cadáver, a falta de estudos com testes comercialmente disponíveis e validações foi reportada (DA FONSECA VICTER et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar e avaliar o desempenho de diferentes kits moleculares comerciais disponíveis no Brasil para a detecção e quantificação do HIV e HCV em amostras de sangue de doador cadáver através de contaminação artificial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar a metodologia de extração e detecção de ácido nucleico do HIV e HCV em amostras de sangue periférico, soro e plasma obtido de doadores cadáveres através de contaminação artificial com os respectivos vírus.

Avaliar o desempenho dos testes comerciais para detecção de ácido nucléico do HIV e HCV e comparar a detecção do controle interno para validação dos testes moleculares em amostras de sangue periférico, soro e plasma de cadáveres.

Avaliar e comparar a sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos positivo e negativo dos diferentes testes moleculares comerciais.

4 METODOLOGIA

A definição dos doadores cadáveres de órgãos e tecidos respeitou os critérios estabelecidos na Resolução da Diretoria Colegiada da Anvisa, RDC Nº 55, de 11/12/2015, publicada no Diário Oficial da União em 14/12/2015, que dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos Humanos para uso terapêutico, bem como a portaria nº2.600/GM de 21 de outubro de 2009 que estabelece o regulamento técnico do sistema nacional de transplantes.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da PUCPR sob parecer número 83139718.5.0000.0020.

Não houve nenhum conflito de interesse entre os pesquisadores e as marcas de kits estudadas.

O *manuscript* do artigo foi submetido para a revista *Journal of Clinical Virology*, com fator de impacto 3.020, Q1 na área de Medicina e Doenças Infecciosas no Scimago e Qualis B1 perante a qualificação da plataforma Sucupira para o estrato Medicina I, e encontra-se no tópico a seguir (resultados) em forma de artigo, com os tópicos introdução, material e métodos, resultados, discussão e conclusão desenvolvidos.

5 RESULTADOS

Manuscript do artigo submetido para publicação na revista revista Journal of Clinical Virology.

TITLE:

Detection and Quantification of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Cadaveric Tissue Donors Using Different Molecular Tests

RUNNING TITLE:

HIV and HCV detection in cadaveric donors

AUTHORS:

Victoria Stadler Tasca Ribeiro (1), Sonia Mara Raboni (2), Paula Hansen Suss (1), Juliette Cieslinski (1), Letícia Kraft (1), Jucélia Stadinicki dos Santos (2), Luciane Pereira (2), Felipe Francisco Tuon (1)

(1) Laboratory of Emerging Infectious Diseases, School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR, 80215-901, Brazil.

(2) Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 80060-900, Brazil

CORRESPONDING AUTHOR:

Felipe F. Tuon

Phone/Fax: 55-41-3071 1133

Email: felipe.tuon@pucpr.br or flptuon@gmail.com

Rua Imaculada Conceição, 1155

Curitiba, PR, Brazil

ZIP Code 80215-901

HIGHLIGHTS

- Transmission of infectious diseases can occur in organ and tissue transplantations
- NAT tests can detect the viruses sooner than serologic tests
- Cadaveric blood specimens are usually of poor quality, with inhibition factors
- There is a lack of available and validated tests for cadaveric specimens in Brazil
- Assays have a wide variability to accurately provide results on cadaveric specimens

Abstract

Background: Tissues from cadaveric donors are used in several clinical circumstances, and the transmission of infectious diseases has been reported. Cadaveric donor (CD) blood sample analysis is challenging due to its poor quality. However, studies have demonstrated the usefulness of molecular based methods, and the lack of studies using available commercial molecular tests was reported.

Objective: The aim of this study was to evaluate the performance, specificity, sensitivity, and accuracy of different commercial molecular tests for HIV and HCV detection and quantification in CD through spiked samples.

Study design: 20 CD and 20 blood donor samples were tested using 1,000 copies/mL and 1,000 IU/mL of lyophilized standards of HIV and HCV, respectively. Samples were analyzed by different molecular kits: XPERT HCV Viral Load and HIV-1 (Cepheid), COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 and COBAS[®] TaqMan[®] HCV Test, v2.0 (Roche), and artus[®] HI Virus-1 QS-RGQ and artus[®] HCV RG RT-PCR Kit (Qiagen).

Results: HIV and HCV in CD were detected by RT-PCR-based quantitative kits. The tests performed by the Cepheid and the Roche kits showed the most accurate, sensitive and specific results, however, a wide variability between the assays and kits was observed. The Qiagen kits did not demonstrate satisfactory results.

Conclusions: CD evaluation showed great variability. The Cepheid and Roche kits were more sensitive for detecting HIV on CD and Cepheid was the most efficient kit for HCV quantification in CD. The Roche and Cepheid kits can be used to screen tissue donors for HIV and HCV.

Keywords: HIV, HCV, deceased donor, tissue bank, molecular biology

INTRODUCTION

Tissue banks evaluate potential donors with several serological screening tests for infectious diseases. These tests can vary according to the tissue and the patient's origin, including risk for endemic infectious diseases [1-5]. Despite the rigorous microbiological and viral screening of tissue donors, transmission of infectious diseases has been reported [6-10], such as cytomegalovirus, rabies, prion disease, hepatitis B virus, hepatitis C virus (HCV), and human immunodeficiency virus (HIV).

Several analytical methods can be performed in tissue donors samples for HIV and HCV diagnosis, including testing for antibodies, antigens and nucleic acids (NAT) [4, 11-14]. All these tests are specific and sensitive; however, NAT and other molecular-based methods can detect the viruses sooner than antibodies and antigens tests, increasing the safety of the donated tissues [4, 5, 15-18]. Cadaveric serum and plasma specimens are usually collected after circulation and are often of poor quality. This is due to effects of hemolysis, hemodilution, autolysis, bacterial growth, and other factors, which can interfere in immunological tests (antigen and antibody) [18].

Considering the shortage of available tests for cadaveric specimens that are developed, validated for use and standardized in Brazil, the aim of this study was to evaluate the specificity, sensitivity, and accuracy of different commercial molecular tests for the detection and quantification of HIV and HCV in peripheral blood samples from cadaveric donors through spiked samples.

MATERIALS AND METHODS

Experimental study design

The definition of cadaveric tissue donors used the Brazilian criteria established by regulatory agencies [19]. This study was approved by the Ethics Committee of Pontifícia Universidade Católica do Paraná (approval number 83139718.5.0000.0020). All samples were obtained after donor or family authorization. A total of 20 samples from cadaveric donors and 20 samples from blood donors were collected from April/2018 to October/2018 and stored at -80°C until testing (Figure 1).

Sample collection, storage and organization

Peripheral blood samples from 20 cadaveric tissue donors were collected into serum tubes (Vacutainer[®], BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and in EDTA K2 tubes for plasma (Vacutainer[®], BD Biosciences, San Jose, CA, USA). In this group, 20 samples were spiked with 1,000 copies/mL HIV, 20 samples were spiked with 1,000 IU/mL HCV, and 10 samples were not spiked and used as negative controls for both HIV (5 samples) and HCV (5 samples). For HIV tests, only the plasma aliquots were used, while the HCV tests were performed using serum aliquots (except when using Qiagen kits, which used plasma for both tests, see below).

In addition, peripheral blood samples from 20 blood donors were collected after informed authorization. The peripheral blood samples were collected into serum and plasma tubes. In this group, 10 samples were spiked with HIV, 10 samples were spiked with HCV, and, as

above, 10 samples were not spiked and used as negative controls for both HIV (5 samples) and HCV (5 samples). For HIV tests, only plasma aliquots were used, while HCV tests were performed with serum aliquots (except for Qiagen kits, which used plasma for both tests, see below).

For both groups (cadaveric and blood donors), the tubes were homogenized according to the manufacturer's recommendation and centrifuged at $3,500 \times g$ for 15 minutes at room temperature, according to Gubbe et al. [14]. One mL aliquots were stored at -80°C . Fresh samples (immediately processed and analyzed after collection) from both groups were previously tested for HIV and HCV by two distinct standardized routine serological methodologies (immunoenzymatic assays, 4th generation) and NAT, with the aim of excluding contaminated samples (Figure 1).

Characteristics of Molecular Detection Kits

Tests were performed according to the manufacturer's instructions for use (IFU), using six different kits commercialized in Brazil. XPERT HCV Viral Load (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), XPERT HIV-1 (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), COBAS[®] TaqMan[®] HIV-1 Test, v2.0 (Roche, Meylan, France), COBAS[®] TaqMan[®] HCV Test, v2.0 (Roche, Meylan, France), artus[®] HI Virus-1 QS-RGQ (Qiagen, Hamburg, Germany) and artus[®] HCV RG RT-PCR Kit (Qiagen, Hamburg, Germany). The IFU do not include instructions for specimen collection, storage and handling of cadaveric specimens.

Spiking technique using Viral Standards from National Institute and Biological Standards and Control (NIBSC)

Viral lyophilized standards of HIV-1 RNA 16/194 (NIBSC/WHO/2017) and HCV NAT 14/150 (NIBSC/WHO/2016) were diluted with molecular grade water (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), according to their respective IFU. Each standard was then aliquoted and stored at -80 °C until use (Figure 1).

The samples of plasma or sera for each group were contaminated with 1,000 copies/mL of HIV-1 and 1,000 IU/mL of HCV, separately. They were then immediately tested using the detection protocol described below (Figure 1).

Detection Protocol using molecular detection

All tests were performed strictly according to the IFU. All kits used the methodology based on PCR tests. Interpretation of the results was done using the software for each kit. In addition to the spiked and negative samples, internal, positive and negative controls were evaluated in each reaction to validate the reaction, according to IFU.

Sample characteristics and clinical data from each donor were collected and evaluated. These included: hemolysis none, + (mild), ++ (moderate) and +++ (severe), hemodilution, fibrin clot, gender, age, hospital of origin, city, state, use of antibiotics, cause of death, comorbidities, presence of infection, day and time of death, and time of sample collection.

Statistical analyses

Results were compiled and analyzed using mean, standard deviation (SD) and Cohen's kappa coefficient (κ), which was calculated to measure inter-rater agreement for qualitative (categorical) items. Fisher's exact test was performed to correlate the sample quality and assay results. The evaluation of operational characteristics of the PCR-based tests was made through a comparison of the results obtained using the different kits. Sensitivity, specificity and accuracy were calculated. Moreover, the Student's T-test and p value concordance were also calculated with GraphPad Prism 7 (GraphPad Prism Software Inc., San Diego, USA).

RESULTS

Cadaveric donors' and samples' characteristics

Among the cadaveric donor samples, some showed hemolysis + (n=7), lipemic characteristic (n=1) and fibrin clots (n=3). Twelve patients were under antibiotic therapy; but sepsis or active bacterial infection was diagnosed in only 6 donors. In two donors, hemodilution (increased plasma volume in relation to red cells) was detected, one donor presented increased bilirubin, and one donor had a positive HTLV serology. None of these factors were associated with tests results (invalidity, positive or negative results, $p > 0.05$). The mean time difference between death and sample collection was 03:37 h, ranging from 01:05 h to 11:14 h. The cadaveric donors' mean age was 51.5 years old, ranging from 8 to 77 years old. In addition, 55% of donors were men. Twenty five percent of donations were heart (for valves), 75% the cornea, 10% bones, and 5% skin. Samples collected from blood donors had no alterations (such as hemolysis, lipemic characteristic, or fibrin clots). Among the samples, 60% were from women, while 40% were from men. All donor specimens tested for HIV-1/2 and HCV using two distinct serological methodologies (immunoenzymatic assays, 4th generation) and routine NAT prior to using the specimen for the study, and one blood donor had HCV reactivity with serological methodologies, being excluded from the study.

HIV Molecular Detection Kits evaluation

When analyzing Cepheid's XPERT HIV-1, 19 out 20 samples from cadaveric donors had virus detected and the viral load quantified, with a mean quantification of 2.83 log (SD 0.13) and 703.95 copies/mL (SD 216.15). Only one sample had an invalid result (unable to obtain result), indicating that some factor inhibited the reaction. For the same kit, 10 out 10 samples from blood donors were able to have the viral load quantified, with a mean quantification of 2.80 log (SD 0.04) and 629.60 copies/mL (SD 68.75). None of the negative controls from cadaveric donors had virus detected, demonstrating 100% specificity. In addition, the accuracy of this test for cadaveric samples spiked with HIV was 96% (Table 2).

For Roche's COBAS® TaqMan® HIV-1 Test, v2.0, HIV was detected and quantified in all samples from cadaveric donors, with a mean quantification of 2.41 log (SD 0.16) and 274.60 copies/mL (SD 90.10). For the same kit, all samples from blood donors were quantified, and had a viral load with a mean quantification of 2.25 log (SD 0.13) and 186.50 copies/mL (SD 55.08). None of the negative controls from cadaveric donors showed amplification of virus, demonstrating 100% specificity. Additionally, the accuracy of this test for cadaveric samples spiked with HIV was 100% (Table 2).

Qiagen's artus® HI Virus-1 QS-RGQ had a mean quantification of 2.63 log (SD 0.52) and 690 copies/mL (SD 603.49) for cadaveric donor samples. However, 6 out the 20 samples were invalid and 4 did not have virus detected. In the negative controls, 3 were invalid and 2 did not have virus detected. For the blood donors, all samples had virus detected, with a mean quantification of 2.82 (SD 0.25) and 750 copies/mL (SD 382.88). Moreover, all the negative controls did not have virus detected. Due to the invalid results on the negative controls from

cadaveric samples, the test specificity was 40%. In addition, the accuracy of this test for cadaveric samples spiked with HIV was 48% (Table 2).

Comparing the quantitative results, the tests showed distinct results with a statistical difference between Roche vs. Qiagen ($p = 0.0028$) and between Roche vs. Cepheid ($p = 0.0002$). When comparing Qiagen vs. Cepheid, no significant difference was observed ($p = 0.9925$). Furthermore, the same analysis for blood donor samples demonstrated a significant difference between Roche vs. Qiagen ($p \leq 0.0001$) and Roche vs. Cepheid ($p = 0.0005$), however, Qiagen vs. Cepheid showed no significant difference ($p = 0.4710$) (Figure 2).

Regarding the qualitative results, an almost perfect agreement was observed between Cepheid and Roche, while a slight agreement could be observed between Cepheid- and Roche vs. the Qiagen kits (Table 1).

HCV Molecular Detection Kits evaluation

The Cepheid's XPERT HCV Viral Load could quantify all 20 cadaveric donor samples, reporting a mean quantification of 2.50 log (SD 0.17) and 343.35 IU/mL (SD 134.36), 100% accuracy and 100% sensitivity. Blood donors' samples showed 10 out 10 detection with a mean quantification of 2.51 log (SD 0.12) and 333.60 IU/mL (SD 84.29). None of the negative controls from cadaveric samples had virus detected, demonstrating 100% specificity (Table 2).

The Roche's COBAS® TaqMan® HCV Test, v2.0 showed a mean quantification of 2.62 log (SD 0.30) and 501.11 IU/mL (SD 308.96) for cadaveric donor samples, however, 2 out of the

20 samples showed no detection of virus and 2 out 20 samples showed an invalid result. Moreover, 2 out 5 negative controls showed an invalid result, demonstrating 60% specificity, 80% sensitivity and 76% accuracy. For the blood donor samples, all showed quantification with a mean of 2.53 log (0.51) and 571.28 IU/mL (SD 560.03). All negative control samples did not have virus detected (Table 2).

For the Qiagen's artus[®] HCV RG RT-PCR Kit, the cadaveric spiked donor samples showed that 8 were invalid and 12 did not have virus detected, while the negative controls showed that 4 were invalid and 1 did not have virus detected, demonstrating that the test had 0% accuracy, 20% specificity and 0% sensitivity (Table 2). For spiked blood donor samples, the mean quantification was 2.68 log (SD 0.20) and 528 IU/mL (SD 241.33), and all negative controls did not have virus detected.

The tests between brands showed no significant difference when comparing Cepheid vs. Roche ($p = 0.4104$). Furthermore, the same analysis for blood donor samples demonstrated no significant difference among the brands; Roche vs. Qiagen ($p = 0.9600$), Roche vs. Cepheid ($p = 0.3090$) and Qiagen vs. Cepheid ($p = 0.4502$) (Figure 3) (Figure 3).

DISCUSSION

HIV and HCV in cadaveric samples could be detected by PCR-based quantitative kits, and the tests performed by Cepheid and Roche showed the most accurate, sensitive and specific results. However, a wide variability between the tests and kits quantification was found. Blood donor samples showed less variability than the cadaveric ones when HIV was tested. These samples also showed no inhibition or false-negative results. The Qiagen kit showed wider variability than the other kits for HIV.

Quantitative molecular-based methods showed that the turnaround time is short, and it is possible using these methods when using approximately 1,000 copies or IU/ml. Complementary to these data, our results with the different assays performed in this study have demonstrated good agreement between tests [20-22]. Cadaveric samples are known to contain inhibitory factors that may lead to invalid or false-negative results. These include: hemodilution, increased bilirubin, hemolysis, sepsis or active bacterial infection and viral detection and may affect the reaction[23-25]. Similar results were observed in this study comparing kits and samples quality, where altered cadaveric samples showed invalid results. Qualitative and quantitative tests using living donors and clinical samples are reported using different tests and approaches. Amendola et al., 2014 have demonstrated the ability of two commercially available assays to quantify low levels of HIV-1 RNA, using clinical and spiked samples from living donors [26], and the results of this work showed high accuracy and sensitivity, being able to detect as low as 3.5 copies/mL of HIV-1 RNA with 95% of probability.

Moreover, a study for HCV RNA quantification using human plasma and serum and NIBSC standards showed robust and reliable assays, exhibiting high sensitivity and specificity [27].

Usually, qualitative NAT tests have been recommended to be used to analyze cadaveric samples, which have showed higher specificity, accuracy and sensitivity [14], detecting lower viral loads than quantitative NAT tests. In Brazil, only quantitative PCR tests are commercially available to detect these pathogens. However, this probably would not change the findings, as the results observed most likely are a consequence of the DNA/RNA purification system. The utility of the quantitative results of these assays should be interpreted and used only for complement screening. In the tissue banks, any inconclusive or controversial result is a subject to discharge the tissues.

This study has some limitations. (i) The samples were spiked with a viral load of 1,000 copies/mL, thus, this test cannot be reliable for tests in cadaveric donor with lower viral loads. However, in the acute phase of HCV/HIV, where antibody-based tests can be negative, viral loads are extremely high, reducing this limitation [28, 29]. (ii) Another point to highlight is that quantitative tests might fail in situations of elite controllers (people who have undetectable viral load even without treatment), but these cases would be detected by serological tests [30], which remain mandatory for tissue transplantation. (iii) Quantitative kits cannot be as sensitive as qualitative NAT tests. The assays we validated in this study are not used or indicated for these kinds of samples, thus, we suggest using only when specific commercial cadaveric tests are not available.

The evaluation and comparison of the different tests and brands showed that the assays have a wide variability in their ability to accurately and reliably provide results on cadaveric specimens. The Cepheid and Roche kits were more sensitive in detecting HIV/HCV on cadaveric samples than the Qiagen kit. The Roche and Cepheid kits can be used for screening tissue donors for HIV and HCV with more than 1,000 copies or IU/ml, respectively.

Acknowledgments

We are grateful to the participants of this study, as well as the Banco de Tecidos Humanos from PUCPR, Genoprimer and Hospital de Clínicas (HC-UFPR) staff for helping us with this work.

Conflict of interest/disclosures

None.

Funding

This work was supported by a grant of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (17/2017 CNPq/ANVISA, process number 441762/2017-4). We did not receive resources from any of the companies that supplied kits used in this work.

REFERENCES

1. Greenwald MA, Kuehnert MJ, Fishman JA: **Infectious disease transmission during organ and tissue transplantation.** *Emerg Infect Dis* 2012, **18**(8):e1.
2. Grossi PA, Fishman JA, Practice ASTIDCo: **Donor-derived infections in solid organ transplant recipients.** *Am J Transplant* 2009, **9** Suppl 4:S19-26.
3. Guyotat D, Nicolas JF, Augey F, Fiere D, Thivolet J: **Porphyria cutanea tarda after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia.** *Am J Hematol* 1990, **34**(1):69-70.
4. Pruss A, Caspari G, Kruger DH, Blumel J, Nubling CM, Gurtler L, Gerlich WH: **Tissue donation and virus safety: more nucleic acid amplification testing is needed.** *Transpl Infect Dis* 2010, **12**(5):375-386.
5. Victor TN, Dos Santos CS, Bao SN, Sampaio TL: **Deceased tissue donor serology and molecular testing for HIV, hepatitis B and hepatitis C viruses: a lack of cadaveric validated tests.** *Cell Tissue Bank* 2016, **17**(4):543-553.
6. Eastlund T: **Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection.** *Cell Transplant* 1995, **4**(5):455-477.
7. Tomford WW: **Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts.** *J Bone Joint Surg Am* 1995, **77**(11):1742-1754.
8. Conrad EU, Gretch DR, Obermeyer KR, Moogk MS, Sayers M, Wilson JJ, Strong DM: **Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation.** *J Bone Joint Surg Am* 1995, **77**(2):214-224.
9. Fishman JA, Greenwald MA, Grossi PA: **Transmission of infection with human allografts: essential considerations in donor screening.** *Clin Infect Dis* 2012, **55**(5):720-727.
10. Ison MG, Llata E, Conover CS, Friedewald JJ, Gerber SI, Grigoryan A, Heneine W, Millis JM, Simon DM, Teo CG *et al*: **Transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from an organ donor to four transplant recipients.** *Am J Transplant* 2011, **11**(6):1218-1225.
11. Delmonico FL: **Cadaver donor screening for infectious agents in solid organ transplantation.** *Clin Infect Dis* 2000, **31**(3):781-786.
12. Greenwald MA, Kerby S, Francis K, Noller AC, Gormley WT, Biswas R, Forshee RA: **Detection of human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in postmortem blood specimens using infectious disease assays licensed for cadaveric donor screening.** *Transpl Infect Dis* 2018, **20**(1).
13. Meyer T, Polywka S, Wulff B, Edler C, Schroder AS, Wilkemeyer I, Kalus U, Pruss A: **Virus NAT for HIV, HBV, and HCV in Post-Mortal Blood Specimens over 48 h after Death of Infected Patients - First Results.** *Transfus Med Hemother* 2012, **39**(6):376-380.
14. Gubbe K, Scharnagl Y, Grosch S, Tonn T, Schmidt M, Hourfar KM, Karl A, Seifried E, Wilkemeyer I, Kalus U: **Validation of Virus NAT for HIV, HCV, HBV and HAV Using Post-Mortal Blood Samples.** *Transfus Med Hemother* 2012, **39**(6):381-385.
15. Dodd R, Kurt Roth W, Ashford P, Dax EM, Vyas G: **Transfusion medicine and safety.** *Biologicals* 2009, **37**(2):62-70.
16. Koppelman MH, Cuijpers HT, Wessberg S, Valkeajarvi A, Pichl L, Schottstedt V, Saldanha J: **Multicenter evaluation of a commercial multiplex polymerase chain reaction test for screening plasma donations for parvovirus B19 DNA and hepatitis A virus RNA.** *Transfusion* 2012, **52**(7):1498-1508.
17. Vermeulen M, Lelie N, Sykes W, Crookes R, Swanevelder J, Gaggia L, Le Roux M, Kuun E, Gulube S, Reddy R: **Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa.** *Transfusion* 2009, **49**(6):1115-1125.
18. Kalus U, Wilkemeyer I, Caspari G, Schroeter J, Pruss A: **Validation of the Serological Testing for Anti-HIV-1/2, Anti-HCV, HBsAg, and Anti-HBc from Post-mortem Blood on the Siemens-BEP-III Automatic System.** *Transfus Med Hemother* 2011, **38**(6):365-372.

19. ANVISA: **Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico. Resolução RDC n55 2015.**
20. Pronier C, Boukthir S, Courtellemont L, Lagathu G, Maillard A, Thibault V: **Performance comparison of new Veris and Xpert random access HIV-1 RNA quantification assays.** *Virology* 2018, **15**(1):156.
21. Senechal B, James VL: **Ten years of external quality assessment of human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification.** *J Clin Microbiol* 2012, **50**(11):3614-3619.
22. Nolte FS: **Impact of viral load testing on patient care.** *Arch Pathol Lab Med* 1999, **123**(11):1011-1014.
23. Strong DM, Nelson K, Pierce M, Stramer SL: **Preventing disease transmission by deceased tissue donors by testing blood for viral nucleic acid.** *Cell Tissue Bank* 2005, **6**(4):255-262.
24. Wilkemeyer I, Pruss A, Kalus U, Schroeter J: **Comparative infectious serology testing of pre- and post-mortem blood samples from cornea donors.** *Cell Tissue Bank* 2012, **13**(3):447-452.
25. Kitchen AD, Gillan HL: **The serological screening of deceased tissue donors within the English Blood Service for infectious agents--a review of current outcomes and a more effective strategy for the future.** *Vox Sang* 2010, **98**(3 Pt 1):e193-200.
26. Amendola A, Marsella P, Bloisi M, Forbici F, Angeletti C, Capobianchi MR: **Ability of two commercially available assays (Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Version 2.0) to quantify low HIV-1 RNA Levels (<1,000 copies/milliliter): comparison with clinical samples and NIBSC working reagent for nucleic acid testing assays.** *J Clin Microbiol* 2014, **52**(6):2019-2026.
27. Sizmann D, Boeck C, Boelter J, Fischer D, Miethke M, Nicolaus S, Zadak M, Babel R: **Fully automated quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA in human plasma and human serum by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system.** *J Clin Virol* 2007, **38**(4):326-333.
28. Kitchen AD, Newham JA, Gillan HL: **Effective serological and molecular screening of deceased tissue donors.** *Cell Tissue Bank* 2013, **14**(4):633-644.
29. Zou S, Dodd RY, Stramer SL, Strong DM, Tissue Safety Study G: **Probability of viremia with HBV, HCV, HIV, and HTLV among tissue donors in the United States.** *N Engl J Med* 2004, **351**(8):751-759.
30. Cilliers K, Muller CJF, Page BJ: **Human immunodeficiency virus in cadavers: A review.** *Clin Anat* 2019, **32**(4):603-610.

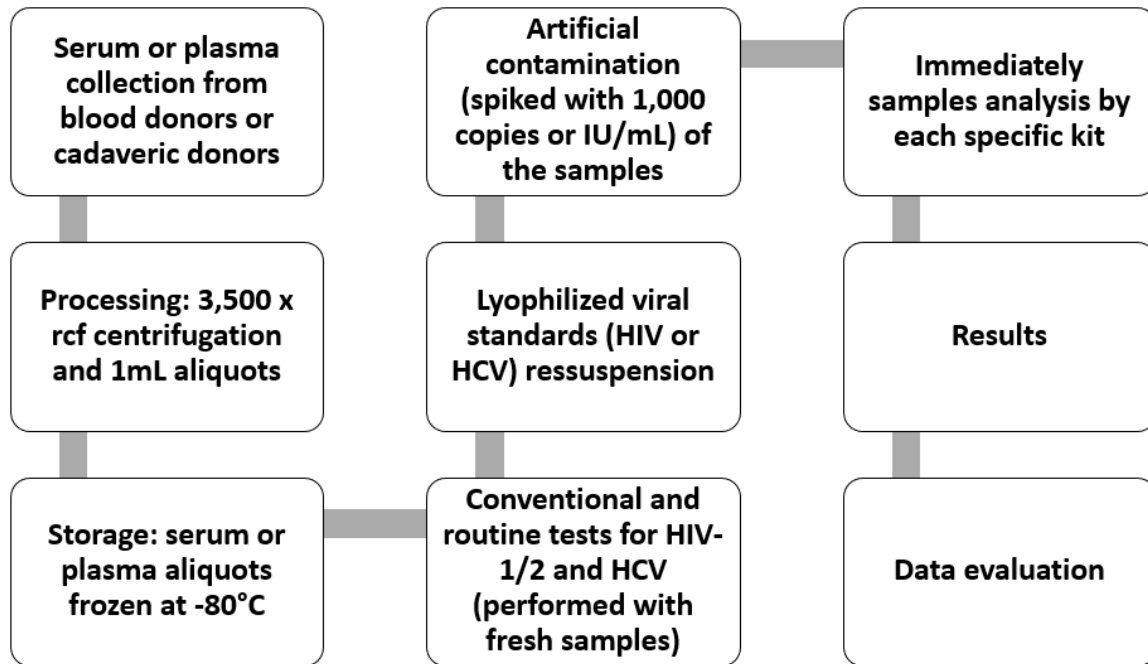
FIGURES and TABLES

Figure 1. Processing scheme of samples (of both groups – blood and cadaveric donors)

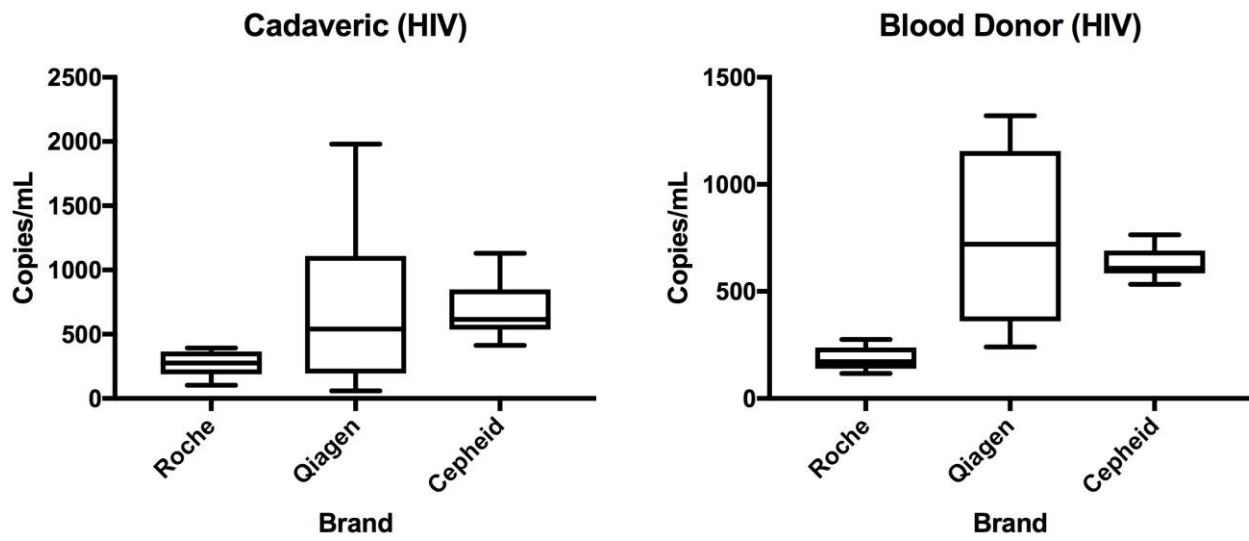


Figure 2. Boxplot indicating HIV (copies/mL) mean detection and SD among the brands for cadaveric and blood donor samples by Student's T-test. For CD group (left), all spiked samples were included (n=20) for each test. For BD group (right), all spiked samples were included (n=10). For CD group and for each brand, invalid results were considered as 0.

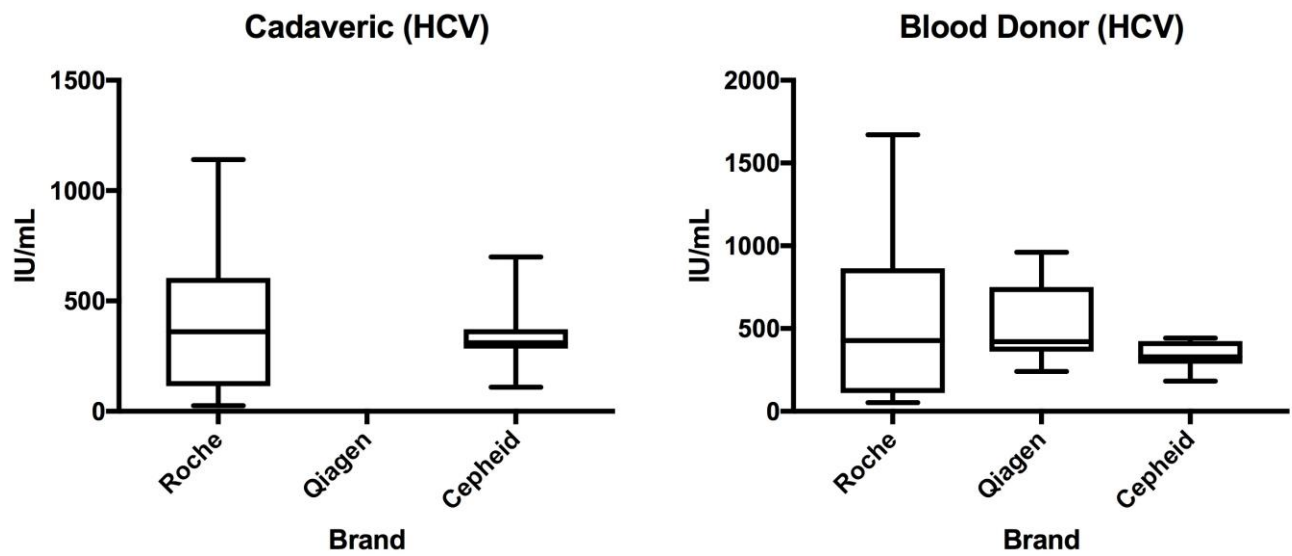


Figure 3. Boxplot indicating HCV (IU/mL) mean detection and SD among the brands for cadaveric and blood donor samples by Student's T-test. For the cadaveric sample figure, the Qiagen brand was not shown due to a lack of amplification. For CD group (left), all spiked samples were included (n=20) for each test. For BD group (right), all spiked samples were included (n=10). For CD group and for each brand, invalid results were considered as 0.

Table 1. Cadaveric blood samples' characteristics. Data such as donated tissue(s), gender, age, city and state, hospital of origin, date and time of death, date and collection time and time difference, use of antibiotics, other observation(s) such as hemolysis, *causa mortis* (CM), presence of fibrin clots, hemodilution, presence of infection and lipemic sample.

Donor ID	Donated tissue(s)	Gender	Age	City	State	Hospital of origin	Date and time of death	Date and collection time	Time difference	Use of antibiotics	Observation(s)
1	Cornea, Heart	F	57	Curitiba	PR	Cajuru	05/04/2018, 5:54h	05/04/2018, 11:20h	05:26	Cefazolin	No hemolysis CM: Subaracnoide bleeding. Reagent HTLV
2	Cornea	M	40	Curitiba	PR	Cajuru	13/04/2018, 09:00h	13/04/2018, 11:00h	02:00	Cefepime, Meropenem, Vancomycin and Polymyxin	No hemolysis. CM: Recurrent pneumonia and pulmonary sepsis
3	Cornea, Heart	M	50	Curitiba	PR	Evangélico	18/04/2018, 10:20h	18/04/2018, 15:00h	04:40	Rocefin and Flagyl	No hemolysis. CM: Cardiogenic shock
4	Cornea, Heart, Bones and Skin	F	31	Curitiba	PR	Evangélico	07/05/2018, 18:20h	07/05/2018, 23:00h	04:40	Maxcef	No hemolysis CM: Aneurysm
5	Cornea	F	65	Curitiba	PR	Marcelino Champagnat	11/05/2018, 14:00h	11/05/2018, 17:00h	03:00	Ceftriaxone, Meropenem	No hemolysis CM: Lung cancer. Urinary tract infection by <i>Escherichia coli</i>
7	Cornea	M	55	Curitiba	PR	Santa Casa	26/05/2018, 11:10h	26/05/2018, 15:20h	04:10	Cefazolin	Hemolysis +, hemodiluted. CM: Hemorrhagic shock
8	Cornea	F	54	Curitiba	PR	Santa Casa	18/06/2018, 05:56h	18/06/2018, 10:00h	04:04	Ceftriaxone, Metronidazole	No hemolysis. CM: Alzheimer and cardiogenic shock
9	Cornea, Bones	M	54	Curitiba	PR	Santa Casa	25/06/2018, 00:20h	25/06/2018, 5:00h	04:40	None	No hemolysis. CM: Heart attack
10	Cornea, Heart	M	8	Curitiba	PR	Cajuru	25/06/2018, 15:12h	25/06/2018, 17:00h	01:48	None	Lipemic and Hemolysis +. CM: Severe head trauma
12	Cornea	F	55	Curitiba	PR	São Vicente	21/07/2018, 13:30h	21/07/2018, 18:00h	04:30	None	Hemolysis +. CM: In consequence of Polio and sequels
13	Cornea	F	47	Curitiba	PR	São Vicente	09/08/2018, 16:32h	09/08/2018, 9:00h	02:28	None	No hemolysis. CM: Metastatic ovary cancer
16	None	F	37	Curitiba	PR	Cajuru	18/09/2018, 06:30h	18/09/2018, 10:30h	04:00	Ceftriaxone	Hemolysis + and fibrin clot. CM: Aneurysm
17	Cornea	M	50	Curitiba	PR	Marcelino Champagnat	18/09/2018, 15:50h	18/09/2018, 17:00h	01:10	None	No hemolysis. Fibrin clot. CM: Metastatic bleeding intestinal adenocarcinoma
18	None	M	58	Curitiba	PR	Cajuru	21/09/2018, 00:46h	21/09/2018, 12:00h	11:14	Cefazolin	No hemolysis and fibrin clot. CM: AVEH e HAS
19	None	F	77	Curitiba	PR	Cajuru	21/09/2018, 08:45h	21/09/2018, 12:15h	03:30	None	No hemolysis. Dialitic patient under use of insulin (type 2 DM). CM: Acute pulmonary edema and sepsis with urinary focus
21	Cornea, Heart	M	58	Curitiba	PR	São Vicente	29/09/2018, 12:54h	29/09/2018, 17:00h	04:06	None	Hemolysis +. CM: Unknown
22	None	M	64	Curitiba	PR	Cajuru	02/10/2018, 7:30h	02/10/2018, 9:20h	01:50	Cefazolin, Cefepime, Vancomycin, Tobramycin	Hemolysis +. CM: Brain Neoplasia and sepsis
23	None	M	61	Curitiba	PR	Cajuru	02/10/2018, 08:38h	02/10/2018, 10:00h	01:22	Cefepime, Levofloxacin, Amikacin, Vancomycin, Linezolid	No hemolysis. Hemodiluted. CM: head trauma and meningitis after surgery
24	None	F	45	Curitiba	PR	Cajuru	02/10/2018, 14:55h	02/10/2018, 16:00h	01:05	Cefepime, Ceftriaxone, Meropenem, Levofloxacin, Amikacin	No hemolysis. CM: MRSA sepsis. Hepatic disfunction and increased bilirubin, use of insulin
25	Cornea	M	63	Curitiba	PR	Santa Casa	04/10/2018, 13:37h	04/10/2018, 16:30	02:53	None	Hemolysis +. CM: subit cardiac death

Table 2. Cohen's kappa coefficient (κ) between Cepheid, Roche and Qiagen results for HIV and HCV detection for cadaveric donors' samples. The agreement values established are: <0.00: Poor, 0.00-0.20: Slight, 0.21-0.40: Fair, 0.41-0.60: Moderate, 0.61-0.80: Substantial and 0.81-1.00: Almost perfect.

HIV				HCV		
	Cohen's κ	% of agreement	Agreement	Cohen's κ	% of agreement	Agreement
Cepheid vs. Roche	0.89	97%	Almost perfect	0.80	95%	Almost perfect
Cepheid vs. Qiagen	0.13	44%	Slight	0.33	67%	Fair
Roche vs. Qiagen	0.12	43%	Slight	0.17	53%	Slight

Table 3. Results of sensitivity, specificity and accuracy of each test of each brand, respectively. Sensitivity was calculated using the total of spiked samples from cadaveric donors (n=20), specificity was calculated using the total of non-spiked samples from cadaveric donors (n=5) and accuracy was calculated using the total of quantified samples divided by the total number of both spiked and non-spiked samples from cadaveric donors.

Brand	Virus	Sensitivity	Specificity	Accuracy
Cepheid	HIV	19/20, 95%	5/5, 100%	24/25, 96%
Cepheid	HCV	20/20, 100%	5/5, 100%	25/25, 100%
Roche	HIV	20/20, 100%	5/5, 100%	25/25, 100%
Roche	HCV	16/20, 80%	3/5, 60%	19/25, 76%
Qiagen	HIV	10/20, 50%	2/5, 40%	12/25, 48%
Qiagen	HCV	0/20, 0%	1/5, 20%	0/25, 0%

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A avaliação e comparação dos diferentes testes e marcas mostraram que as amostras de doadores cadáver apresentam grande variabilidade, de acordo do kit utilizado;
- Os kits da Cepheid e da Roche foram mais sensíveis para a detecção do HIV em amostras cadavéricas que o kit da Qiagen;
- O kit da Roche demonstrou menor variação entre os resultados com amostras de doadores cadáver quando contaminadas com HIV;
- Kits da Cepheid e Roche demonstraram boa acurácia, sensibilidade e especificidade;
- O kit da Cepheid foi o mais eficiente para detecção de HCV em amostras cadavéricas, com menos variação entre os resultados utilizando amostras de cadáver e com 100% de acurácia, especificidade e sensibilidade;
- Ambos os kits da Qiagen não apresentaram resultados satisfatórios quando analisadas acurácia, especificidade e sensibilidade;
- Os kits da Roche e Cepheid podem ser utilizados para a triagem de doadores de tecidos para HIV e HCV com mais de 1.000 cópias ou UI/mL, respectivamente.

Em conjunto, os resultados apresentados, levando em consideração as limitações do estudo, sugerem que realizar testes moleculares em amostras de doador cadáver pode melhorar a segurança no transplante de órgãos e tecidos, evitando a liberação de resultados falso-negativos e evitando o descarte de tecidos viáveis por resultados falso-positivos.

Essa abordagem deve também ser considerada para outras doenças altamente prevalentes em nosso país, como arboviroses. Adicionalmente, os testes que tentamos validar nesse estudo não são indicados para amostras de origem cadavérica, portanto, todos os resultados devem ser interpretados cuidadosamente e nunca devem extrapolar os resultados estabelecidos e indicados em pacientes vivos. Além disso, a implementação dessa técnica deve ser conduzida como um complemento à outras metodologias que já se encontram bem estabelecidas, junto a uma estratégia para definir condições ótimas para realizar a triagem do DC.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUNA, G. M. The humanitarian aspects of organ transplantation. **Transplant International**, v. 14, n. 2, p. 117-123, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução-RDC nº 55, de 11 de dezembro de 2015. Dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico.** Disponível em: <http://www.cvs.saude.sp.gov.br/zip/RDC%2055,%2011%2012%202015.pdf>. Acesso em: 19 de setembro de 2018.

AMENDOLA, A. et al. Ability of two commercially available assays (Abbott RealTime HIV-1 and Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Version 2.0) to quantify low HIV-1 RNA Levels (< 1.000 copies/milliliter): comparison with clinical samples and NIBSC working reagent for nucleic acid testing assays. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 6, p. 2019-2026, 2014.

BACCHETTI, P. et al. Incubation period of AIDS in San Francisco. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 251, 1989.

BAGGALEY, R. F. et al. Risk of HIV-1 transmission for parenteral exposure and blood transfusion: a systematic review and meta-analysis. **Aids**, v. 20, n. 6, p. 805-812, 2006.

BALASKA, A. et al. Changes in health-related quality of life in Greek adult patients 1 year after successful renal transplantation. **Exp Clin Transplant**, v. 4, n. 2, p. 521-524, 2006.

BALL, J., DESSELBERGER, U., WHITWELL, H. Long-lasting viability of HIV after patient's death. **The Lancet**, v. 338, n. 8758, p. 63, 1991.

BELLANDI, T. et al. Unintended transplantation of three organs from an HIV-positive donor: report of the analysis of an adverse event in a regional health care service in Italy. **Transplantation proceedings**. Elsevier, 2010. p. 2187-2189.

BIXLER, D. et al. Hepatitis B and C virus infections transmitted through organ transplantation investigated by CDC, United States, 2014-2017. *American Journal of Transplantation*, 2019.

BLANCHETTE, V. et al. Hepatitis C infection in patients with hemophilia: results of a national survey. **Transfusion medicine reviews**, v. 8, n. 3, p. 210-217, 1994.

BRASIL. **RDC 67, de 30 de setembro de 2008. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Oculares de origem humana.** Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0067_30_09_2008.html. Acesso em: 19 de setembro de 2018.

BRASIL. **Portaria MS N8 2.600, de 21 de outubro de 2009. Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes.** Disponível em: http://www.ans.gov.br/images/stories/Legislacao/camara_tecnica/2013_gt_revisao_r ol/20130520-doc12_contribconsnacdessaude regulamentotecnico dosnt.pdf. Acesso em: 19 de setembro de 2018.

BRASIL. **RESOLUÇÃO RDC nº50, DE 20 DE SETEMBRO DE 2011.** Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. **ANVISA**, Brasília, DF, set 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0050_20_09_2011_rep.html. Acesso em: 15 de junho de 2018.

BRASIL. **PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS PARA MANEJO DA INFECÇÃO PELO HIV EM ADULTOS.** Ministério da Saúde. Brasília, DF, 2013. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/protocolo_clinico_manejo_hiv_adultos.pdf. Acesso em: 12 de novembro de 2018.

BRASIL. RESOLUÇÃO RDC Nº55 DE 11 DE DEZEMBRO DE 2015. Dispõe sobre as Boas Práticas em Tecidos humanos para uso terapêutico. **ANVISA**, Brasília, DF, dez 2015. Disponível em: <http://bibliofarma.com/rdc-n-55-de-11-de-dezembro-de-2015/> Acesso em: 15 de junho de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2018. **Boletim epidemiológico HIV/Aids 2018**. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2018/boletim-epidemiologico-hivaids-2018>. Acesso em: 12 de novembro de 2018

BRASIL. Ministério da Saúde, 2018. **BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO HEPATITES VIRAIS, 2018**. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/05/Boletim-Hepatites-2018.pdf>. Acesso em: 12 de novembro de 2018

BRAUN, P. et al. A European multicentre study on the comparison of HIV-1 viral loads between VERIS HIV-1 assay and Roche COBAS® TAQMAN® HIV-1 test, Abbott Real Time HIV-1 assay, and Siemens VERSANT HIV-1 assay. **Journal of Clinical Virology**, v. 92, p. 75-82, 2017.

BUSTIN, S. A. & MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, v. 109, n. 4, p. 365-379, 2005.

CAMPBELL, R. S. F. & ROBINSON, W. F. The comparative pathology of the lentiviruses. **Journal of comparative pathology**, v. 119, n. 4, p. 333-395, 1998.

CAPPY, P. et al. Transfusion of HIV-infected blood products despite highly sensitive nucleic acid testing. **Transfusion**, 2019.

CARBONE, M., MUTIMER, D., NEUBERGER, J. Hepatitis C virus and nonliver solid organ transplantation. **Transplantation**, v. 95, n. 6, p. 779-786, 2013.

CHANG, S. C. et al. Nuclear localization signals in the core protein of hepatitis C virus. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 205, n. 2, p. 1284-1290, 1994.

CHEN, S. et al. Rabies virus transmission in solid organ transplantation, China, 2015–2016. *Emerging infectious diseases*, v. 23, n. 9, p. 1600, 2017.

CHURCHILL, M. J. et al. HIV reservoirs: what, where and how to target them. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 55, 2016.

CLARKE, J. A. HIV transmission and skin grafts. **The lancet**, v. 329, n. 8539, p. 983, 1987.

CONRAD, E. U. et al. Transmission of the hepatitis-C virus by tissue transplantation. **JBJS**, v. 77, n. 2, p. 214-224, 1995.

CURRAN, J. W. et al. Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. **New England Journal of Medicine**, v. 310, n. 2, p. 69-75, 1984.

DA FONSECA VICTER, T. N. et al. Deceased tissue donor serology and molecular testing for HIV, hepatitis B and hepatitis C viruses: a lack of cadaveric validated tests. **Cell and tissue banking**, v. 17, n. 4, p. 543-553, 2016.

DAAR, E. S. et al. Diagnosis of primary HIV-1 infection. **Annals of internal medicine**, v. 134, n. 1, p. 25-29, 2001.

DELMONICO, F. L. Cadaver donor screening for infectious agents in solid organ transplantation. **Clinical infectious diseases**, v. 31, n. 3, p. 781-786, 2000.

DODD, R. Y. et al. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. **Transfusion**, v. 42, n. 8, p. 975-979, 2002.

DODD, R. et al. Transfusion medicine and safety. **Biologicals**, v. 37, n. 2, p. 62-70, 2009.

DOW, B.C. Noise' in microbiological screening assays. **Transfusion Med.** v. 10, p. 97-106, 2000.

EASTLUND, T. Infectious disease transmission through cell, tissue, and organ transplantation: reducing the risk through donor selection. **Cell transplantation**, v. 4, n. 5, p. 455-477, 1995.

EASTLUND, T. Hemodilution due to blood loss and transfusion and reliability of cadaver tissue donor infectious disease testing. **Cell and tissue banking**, v. 1, n. 2, p. 121-127, 2000.

EASTLUND, T. Viral infections transmitted through tissue transplantation. In: **Sterilisation of Tissues Using Ionising Radiations**. Woodhead Publishing, p. 255-278, 2005.

EDLER, C. et al. A prospective time-course study on serological testing for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus with blood samples taken up to 48 h after death. **Journal of medical microbiology**, v. 60, n. 7, p. 920-926, 2011.

EPSY, M.J. et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Review**. v.19,165-256, 2006.

ERICE, A. et al. Human immunodeficiency virus infection in patients with solid-organ transplants: report of five cases and review. **Reviews of infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 537-547, 1991.

EUA. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1988. Semen banking, organ and tissue transplantation, and HIV antibody testing. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 37:57-58, 63, 1988.

EUA. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1988. Transmission of HIV through bone transplantation: Case report and public health recommendations. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.**37:597-599, 1988.

EUA. Food and Drug Administration (FDA), 2002. **Approves First Nucleic Acid Test (NAT) System to Screen Whole Blood Donors for Infections with Human Immunodeficiency Virus (HIV) and Hepatitis C Virus (HCV).** Disponível em: www.fda.gov/bbs/topics/ANSWERS/2002/ANS01140.html. Acesso em: 12 de novembro de 2018

EUA. Food and Drug Administration (FDA), 2017. **Nucleic Acid Testing (NAT) for Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) and Hepatitis C Virus (HCV): Testing, Product Disposition, and Donor Deferral and Reentry.** Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/nucleic-acid-testing-nat-human-immunodeficiency-virus-type-1-hiv-1-and-hepatitis-c-virus-hcv-testing>. Acesso em: 12 de novembro de 2018

EVATT, B. L. et al. The acquired immunodeficiency syndrome in patients with hemophilia. **Annals of internal medicine**, v. 100, n. 4, p. 499-504, 1984.

FABRIZI, F. et al. Meta-analysis of observational studies: hepatitis C and survival after renal transplant. **Journal of viral hepatitis**, v. 21, n. 5, p. 314-324, 2014.

FAUCI, A. S. et al. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. **Annals of internal medicine**, v. 124, n. 7, p. 654-663, 1996.

FIORE, R. J. et al. Detection of HCV RNA in serum and seminal fluid from HIV-1 co-infected intravenous drug addicts. **Journal of medical virology**, v. 46, n. 4, p. 364-367, 1995.

FISHMAN, J. A.; GREENWALD, M. A.; GROSSI, P. A. Transmission of infection with human allografts: essential considerations in donor screening. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 5, p. 720-727, 2012.

FISHMAN, J. A. & GROSSI, P. A. Donor-derived infection—the challenge for transplant safety. **Nature Reviews Nephrology**, v. 10, n. 11, p. 663, 2014.

GALLARDA, J. L. & DRAGON, E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. **Molecular Diagnosis**, v. 5, n. 1, p. 11-22, 2000.

GARCIA, G. G. et al. The global role of kidney transplantation. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 35, n. 5, p. 299-304, 2012.

GASINK, L.B. et al. Hepatitis C virus seropositivity in organ donors and survival in heart transplant recipients. **JAMA**, v. 296, n. 15, p. 1843-1850, 2006.

GUBBE, K. et al. Validation of virus NAT for HIV, HCV, HBV and HAV using post-mortal blood samples. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 381-385, 2012.

GREENWALD, M.A., KUEHNERT, M.J., FISHMAN, J. A. Infectious disease transmission during organ and tissue transplantation. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 8, p. e1, 2012.

GREENWALD, M. A. et al. Detection of human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus in postmortem blood specimens using infectious disease assays licensed for cadaveric donor screening. **Transplant Infectious Disease**, v. 20, n. 1, p. e12825, 2018.

GROSSI, P. A. & FISHMAN, J. A. AST INFECTIOUS DISEASE COMMUNITY OF PRACTICE. Donor-derived infections in solid organ transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. S19-S26, 2009.

GUPTA, R. K. et al. Dengue virus transmission from living donor to recipient in liver transplantation: a case report. *Journal of clinical and experimental hepatology*, v. 6, n. 1, p. 59-61, 2016.

GUYOTAT, D. et al. Porphyria cutanea tarda after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. **American journal of hematology**, v. 34, n. 1, p. 69-70, 1990.

HEIKENS, E. et al. Hepatitis C virus transmission in a Dutch haemodialysis unit: detailed outbreak investigation using NS5A gene sequencing. **Journal of Hospital Infection**, v. 101, n. 3, p. 333-338, 2019

HEIM, A. et al. Evaluation of serological screening of cadaveric sera for donor selection for cornea transplantation. **Journal of medical virology**, v. 58, n. 3, p. 291-295, 1999.

HOSSAIN, M. et al. Quality of life in renal transplant recipient and donor. **Transplant Procedure**. v. 47, p. 1128-30, 2015.

HUANG, L. et al. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A (NS5A) is an RNA-binding protein. **Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 43, p. 36417-36428, 2005.

HUMAR, A. et al. Nucleic acid testing (NAT) of organ donors: is the 'best' test the right test? A consensus conference report. **American Journal of Transplantation**, v. 10, n. 4, p. 889-899, 2010.

ISON, M. G. et al. Donor-derived disease transmission events in the United States: Data reviewed by the OPTN/UNOS Disease Transmission Advisory Committee. **American Journal of Transplantation**, v. 9, n. 8, p. 1929-1935, 2009.

ISON, M. G. et al. Transmission of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus from an organ donor to four transplant recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 6, p. 1218-1225, 2011.

ISON, M. G et al. Preventable errors in organ transplantation: an emerging patient safety issue? **American Journal of Transplantation**, v. 12, n. 9, p. 2307-2312, 2012.

KAZEMEYNI, S. M., CHIME, A. B. I., HEIDARY, A. Worldwide cadaveric organ donation systems (transplant organ procurement). **Urology journal**, v. 1, n. 3, p. 157-164, 2009.

KLAUS, U. et al. Validation of the serological testing for anti-HIV-1/2, anti-HCV, HBsAg, and anti-HBC from post-mortem blood on the Siemens-BEP-III automatic system. **Transfusion Medicine and hemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 365-372, 2011.

KINLOCH, S., REYNOLD, S. J., BOLLINGER, R. C. Acute HIV infection. **Elsevier India Pvt. Ltd**, 843-848. 2012

KINOSHITA, T. et al. Imported hepatitis C virus genotypes in Japanese hemophiliacs. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, n. 1, p. 249-250, 1993.

KOPPELMAN, M. H. G. M. et al. Multicenter evaluation of a commercial multiplex polymerase chain reaction test for screening plasma donations for parvovirus B19 DNA and hepatitis A virus RNA. **Transfusion**, v. 52, n. 7, p. 1498-1508, 2012.

KUCIRKA, L. M. et al. Risk of window period HIV infection in high infectious risk donors: systematic review and meta-analysis. **American Journal of Transplantation**, v. 11, n. 6, p. 1176-1187, 2011.

LACKRITZ, E. M. et al. Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 26, p. 1721-1725, 1995.

LAI, J. C. et al. Reducing infection transmission in solid organ transplantation through donor nucleic acid testing: a cost-effectiveness analysis. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 10, p. 2611-2618, 2013.

LEN, O. et al. Evaluating the risk of transmission of infection from donor to recipient of a solid organ transplantation. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica**, v. 30, p. 19-26, 2012.

LI, H. C. & LO, S. Y. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and treatment. **World journal of hepatology**, v. 7, n. 10, p. 1377, 2015.

MANDELL, G. L., DOUGLAS, R. G., BENNET, R. D. **Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 7th ed. Elsevier, Churchill, Livinstone, Philadelphia, PA. 2009.

MENDEL, I. et al. Detection and genotyping of the hepatitis C RNA in tear fluid from patients with chronic hepatitis C. **Journal of medical virology**, v. 51, n. 3, p. 231-233, 1997.

MEYER, T. et al. Virus NAT for HIV, HBV, and HCV in post-mortal blood specimens over 48 h after death of infected patients—first results. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 376-380, 2012.

NAM, H. et al. Donor-derived viral infections in liver transplantation. *Transplantation*, v. 102, n. 11, p. 1824-1836, 2018.

NOLTE, F. S. Impact of viral load testing on patient care. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 123, n. 11, p. 1011-1014, 1999.

NÜBLING, C. M. et al. Experience of mandatory nucleic acid test (NAT) screening across all blood organizations in Germany: NAT yield versus breakthrough transmissions. **Transfusion**, v. 49, n. 9, p. 1850-1858, 2009.

ORGAN PROCUREMENT AND TRANSPLANTATION NETWORK (OPTN). 2013. **A Rule by the Health and Human Services Department on 07/03/2013. Organ procurement and transplantation network 2013 (Organ procurement and transplantation network**. Final rule (2013) vol 78, 2013/07/10 edn). Disponível em: <https://www.federalregister.gov/documents/2013/07/03/2013-15731/organ-procurement-and-transplantation-network>. Acesso em: 19 de stembro de 2018

PADLEY, D. et al. Challenges in the testing of non-heart-beating cadavers for viral markers: implications for the safety of tissue donors. **Cell and tissue banking**, v. 6, n. 3, p. 171-179, 2005.

PEDERSEN, C. et al. Clinical course of primary HIV infection: consequences for subsequent course of infection. **BMJ**. v. 299, n. 6692, p. 154-157, 1989.

PETERMAN, T. A. et al. Estimating the risks of transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome and human immunodeficiency virus infection. **Transfusion**, v. 27, n. 5, p. 371-374, 1987.

PLATT, L. et al. Prevalence and burden of HCV co-infection in people living with HIV: a global systematic review and meta-analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 7, p. 797-808, 2016.

POLK, B. Frank et al. Predictors of the acquired immunodeficiency syndrome developing in a cohort of seropositive homosexual men. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 2, p. 61-66, 1987.

PRESTERL, E. et al. Blood-Borne Viruses: HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C. In: **Basic Microbiology and Infection Control for Midwives**. Springer, Cham, p. 143-149. 2019.

PRONIER, C. et al. Performance comparison of new Veris and Xpert random access HIV-1 RNA quantification assays. **Virology journal**, v. 15, n. 1, p. 156, 2018.

PRUSS, A. et al. Tissue donation and virus safety: more nucleic acid amplification testing is needed. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 5, p. 375-386, 2010.

ROSSO, F. et al. Transmission of dengue virus from deceased donors to solid organ transplant recipients: case report and literature review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 63-69, 2018.

SCHREIBER, G. B. et al. The risk of transfusion-transmitted viral infections. **New England journal of medicine**, v. 334, n. 26, p. 1685-1690, 1996.

SENECHAL, B. & JAMES, V. L. A. Ten years of external quality assessment of human immunodeficiency virus type 1 RNA quantification. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3614-3619, 2012.

SIMONDS, R. J. et al. Transmission of human immunodeficiency virus type 1 from a seronegative organ and tissue donor. **New England Journal of Medicine**, v. 326, n. 11, p. 726-732, 1992.

SMITH, J. A. & DANIEL, R. Following the path of the virus: the exploitation of host DNA repair mechanisms by retroviruses. **ACS chemical biology**, v. 1, n. 4, p. 217-226, 2006.

SULANIA, A. et al. Organ donation and transplantation: An updated overview. **MAMC Journal of Medical Sciences**, v. 2, p. 18-27, 2016.

SURYAPRASAD, A. et al. Transmission of hepatitis C virus from organ donors despite nucleic acid test screening. **American Journal of Transplantation**, v. 15, n. 7, p. 1827-1835, 2015.

TAGNY, C. T. et al. Blood safety in Sub-Saharan Africa: a multi-factorial problem. **Transfusion**, v. 48, n. 6, p. 1256-1261, 2008.

TAVOSCHI, L. et al. Hepatitis B and C among healthcare workers and patient groups at increased risk of iatrogenic transmission in the EU/EEA: a systematic review. **Journal of Hospital Infection**, 2019.

THEODOROPOULOS, N. et al. Deceased organ donor screening for HIV, hepatitis B, and hepatitis C viruses: a survey of organ procurement organization practices. **American Journal of Transplantation**, v. 13, n. 8, p. 2186-2190, 2013.

THEODOROPOULOS, N. et al. Deceased organ donor screening for human immunodeficiency virus, hepatitis B virus and hepatitis C virus: Discordant serology and nucleic acid testing results. **Transplant Infectious Disease**, v. 20, n. 1, p. e12821, 2018.

THOMPSON, N. D. et al. Nonhospital health care–associated hepatitis B and C virus transmission: United States, 1998–2008. **Annals of Internal Medicine**, v. 150, n. 1, p. 33-39, 2009.

TOMFORD, W. W. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. **JBJS**, v. 77, n. 11, p. 1742-1754, 1995.

UNAIDS. **GLOBAL AIDS UPDATE**. Disponível em: <https://www.who.int/hiv/pub/arv/global-aids-update-2016-pub/en/> 2016. Acesso em: 25 de março de 2019.

VAISHNAV, Y. N. & WONG-STAAAL, F. The biochemistry of AIDS. **Annual review of biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 577-630, 1991.

VELATI, C. et al. Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey. **Transfusion**, v. 48, n. 10, p. 2205-2213, 2008.

VERMEULEN, M. et al. Impact of individual-donation nucleic acid testing on risk of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus transmission by blood transfusion in South Africa. **Transfusion**, v. 49, n. 6, p. 1115-1125, 2009.

WANG, J. T. et al. Hepatitis C virus RNA in saliva of patients with posttransfusion hepatitis and low efficiency of transmission among spouses. **Journal of medical virology**, v. 36, n. 1, p. 28-31, 1992.

WARD, J. W. et al. Laboratory and epidemiologic evaluation of an enzyme immunoassay for antibodies to HTLV-III. **JAMA**, v. 256, n. 3, p. 357-361, 1986.

WILKEMEYER, I. et al. Comparative infectious serology testing of pre-and post-mortem blood samples from cornea donors. **Cell and tissue banking**, v. 13, n. 3, p. 447-452, 2012.

WIESMANN, F. et al. Variation analysis of six HCV viral load assays using low viremic HCV samples in the range of the clinical decision points for HCV protease inhibitors. **Medical microbiology and immunology**, v. 204, n. 4, p. 515-525, 2015.

WITHERELL, G. W. & BEINEKE, P. Statistical analysis of combined substitutions in nonstructural 5A region of hepatitis C virus and interferon response. **Journal of medical virology**, v. 63, n. 1, p. 8-16, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) et al. **Global hepatitis report 2017. World Health Organization.** Disponível em: <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>. Acesso em: 25 de março de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **International Standard 5th WHO International Standard for HCV NAT NIBSC code: 14/150 Instructions for use (Version 2.0, Dated 08/07/2016).** Disponível em: <http://www.nibsc.org/documents/ifu/14-150.pdf>. Acesso em: 19 de setembro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **International Standard Proposed 4th International Standard for HIV-1 RNA NIBSC code: 16/194 Instructions for use (Version 5.0, Dated 16/06/2017).** Disponível em: <http://www.nibsc.org/documents/ifu/16-194.pdf>. Acesso em: 19 de setembro de 2018.

8 ANEXOS

Abaixo encontra-se o *print* da tela do computador referente à submissão do artigo “Detection and Quantification of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Cadaveric Tissue Donors Using Different Molecular Tests” para a revista *Journal of Clinical Virology*, submetido em 02 de julho de 2019.

JOURNAL OF
CLINICAL VIROLOGY

Contact us
Help ?


Username: vicstadler@gmail.com
Switch To: Co-author Go to: [My EES Hub](#)

Version: EES 2019

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Submissions Needing Revision for Co-author Victoria Ribeiro

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display

10

 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Date Revision Due	Status Date	Current Status	View Decision
Action Links	JCV-D-19-00277	Detection and Quantification of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Cadaveric Tissue Donors Using Different Molecular Tests	Jul 02, 2019	Sep 08, 2019	Aug 09, 2019	Revise	Revise

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display

10

 results per page.

Track your recent Co-Authored submission to JCV  [Caixa de entrada x](#)



Journal of Clinical Virology <eesserver@eesmail.elsevier.com>
para eu ▼

 inglês > português [Traduzir mensagem](#)

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Victoria Ribeiro,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Journal of Clinical Virology

Title: Detection and Quantification of Human Immunodeficiency Virus and Hepatitis C Virus in Cadaveric Tissue Donors Using Different Molecular Tests

Corresponding Author: Felipe Tuon

Co-Authors: Victoria Ribeiro; Sonia M Raboni; Paula Suss; Juliette Cieslinski; Leticia Kraft; Jucelia Santos; Luciane Pereira;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/jcv/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Victoria&lname=Ribeiro&email=vicstadler@gmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/jcv/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=vicstadler@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at ftuon@gmail.com or tuon@ufpr.br.

Thank you,

Journal of Clinical Virology