

Un Donador de Sangre con Fiebre

Julian W. Tang,^{1a} Yvonne Ng,² Evelyn S. C. Koay,¹ Gek Har Leow,¹ Eng Soo Yap,³ Douglas Chan,¹
Lip Kun Tan,³ and Paul A. Tambyah⁴

CASO

Se presentó un neonato de 4 días de nacido a las 29 semanas de gestación que desarrolló trombocitopenia (conteo de plaquetas $43 \times 10^9/L$) con asociación de hemorragias intracraneales y pulmonares severas. Se le administraron transfusiones urgentes de 10 mL/kg de concentrado de células rojas y 10 mL/kg de concentrado de plaquetas. Estas fueron obtenidas de donadores con 2 días de anticipación en Singapur por una estudiante universitaria de 21 años que estuvo bien clínicamente en ese momento. El día posterior, estos productos fueron administrados al neonato, la donadora de sangre se comunicó con el servicio de transfusión sanguínea para informar que ahora estaba enferma con una enfermedad con fiebre y catarro. El esquema de plasma en la muestra de la sangre donada fue obtenido y probado por PCR para varios virus, incluyendo dengue, chinkugunya, enterovirus y virus Epstein-Barr.

Se encontró dengue ARN (serotipo 2) en una cantidad muy baja (es decir, en una PCR en tiempo real del ciclo de Ct números 39–40) (Fig. 1A) del extracto inicial de ARN (extracto A). Para confirmar la presencia de ésta baja cantidad de dengue 2 ARN, el mismo extracto (extracto A, el cual ha sido almacenado a $-20^\circ C$) fue vuelto a examinar (Fig. 1B), y de nuevo se encontró un resultado bajo positivo.

DISCUSIÓN

Recientemente, Wilder-Smith y colegas destacaron el importante hecho de la seguridad de la transfusión sanguínea con respecto a la infección de dengue en un país dengue-endémico, como Singapur (1). Aunque en el tiempo de la presentación del reporte Wider-Smith et al. no pudieron identificar ningún evento de transmisión de dengue asociado con la transfusión de sangre, desde entonces se han presentado evidencias convincentes de dichos eventos de transmisión (2). En adición, ha habido por lo menos

PREGUNTAS A CONSIDERAR

- ¿Cuáles serán los siguientes pasos?
- ¿Qué puede causar resultados de PCR falso-negativo y falso-positivo?
- ¿Cómo afectan el manejo del paciente los resultados de PCR bajo-positivo?

1 caso previo de transmisión de dengue en Singapur, vía trasplante de órganos (3).

Fue importante verificar el estado de esta donación de sangre lo más preciso posible, porque este evento dejó implicaciones adicionales al servicio de transfusión de sangre. Se consideraron tres enfoques: repetir el examen del espécimen original, examinar al neonato, y más pruebas al donador.

Se realizó la repetición de la prueba del espécimen, regresando a la muestra original de sangre (almacenada a $4^\circ C$) y re-extrayendo el ARN (extracto B). Todo el ARN fue extraído usando el sistema Biorobot Qiagen EZ1 (Qiagen). En adición, otro extracto de ARN que se había obtenido antes (extracto C), al mismo tiempo que el extracto A, fue recuperado del almacén a $-20^\circ C$ para más pruebas. Se probaron extractos de A, B y C en réplicas de 5 (es decir, $3 \times 5 = 15$ pruebas) en la misma prueba de PCR del ARN del dengue. Sorprendentemente, todas estas pruebas resultaron negativas incluido el extracto A, el cual había tenido resultados bajo positivo dos veces anteriormente. En adición, la prueba de la muestra de suero, retrospectiva de antígeno NS1 de dengue (por ejemplo, la muestra original de suero de donde se extrajeron los A y B) fue también negativa.

El neonato fue examinado de urgencia en busca de ARN de dengue por PCR en los días 2, 5 y 8 después de la transfusión y, afortunadamente, todos los resultados de las pruebas de ARN de dengue salieron negativos. Los resultados de la prueba del antígeno de dengue NS1 también fueron negativos. En ese momento, se pensó que el estado negativo del neonato se debía al bajo volumen de los productos sanguíneos transfundidos (volumen combinado de 16 mL), el cual redujo el potencial de la transmisión del virus del dengue.

En este caso, afortunadamente la donadora accedió a regresar para la prueba de anticuerpos convalecientes para determinar si el dengue u otra infección viral

Departments of ¹ Laboratory Medicine, ² Neonatology, ³ Haematology and ⁴ Medicine, National University Hospital, Singapore.

^a Para enviar correspondencia a este autor, dirigirse a: Department of Laboratory Medicine, National University Hospital, 5 Lower Kent Ridge Road, Singapore 119074, Singapore. Fax +65-67771613; e-mail jwttang49@hotmail.com.

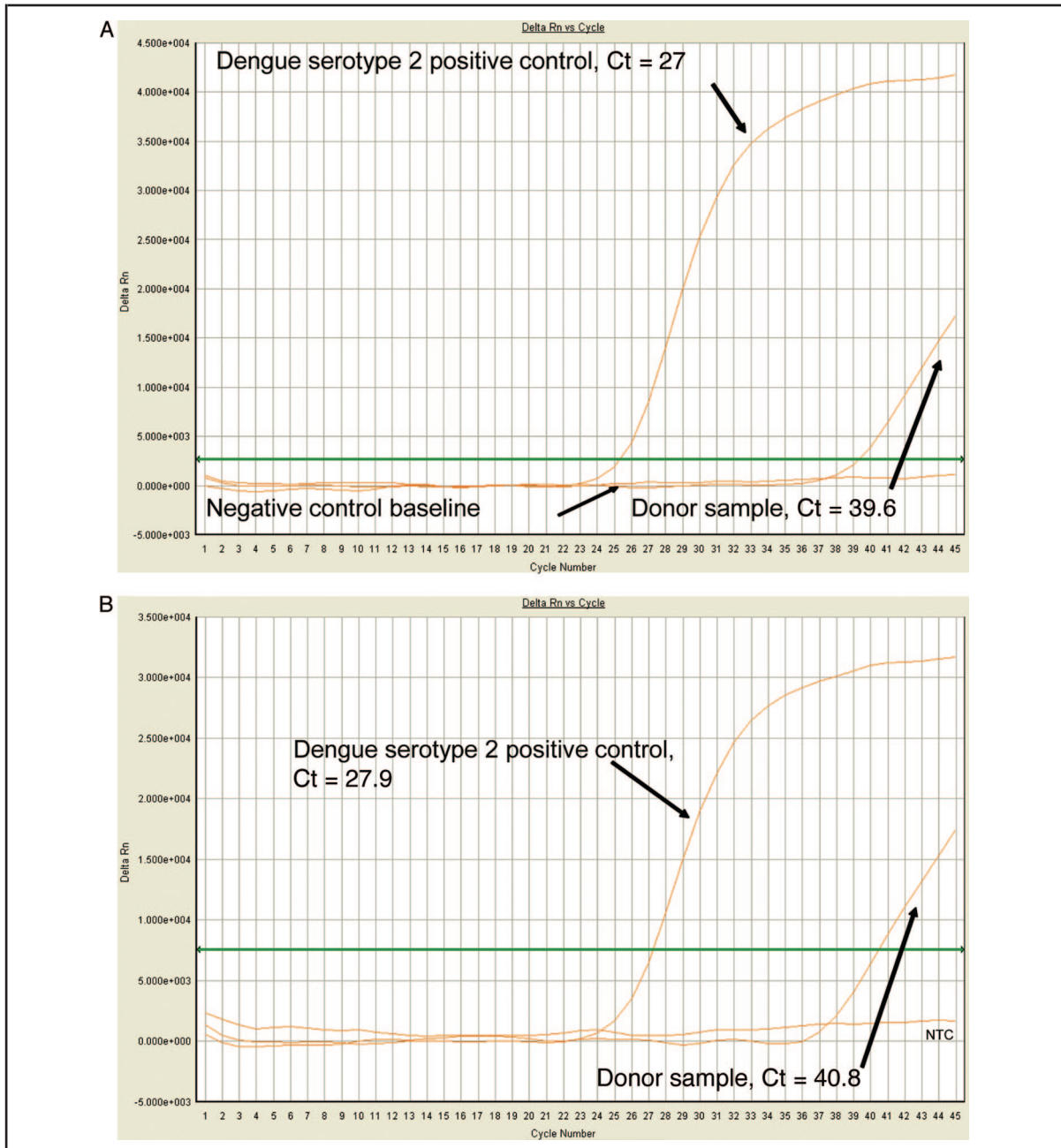


Figura 1. Productos de PCR para la muestra de plasma de los donadores con dengue ARN en tiempo real.

(A), Los resultados en el PCR en el extracto ARN (extracto A, primera prueba) se obtuvo de la primera muestra día donadora mostrando una Ct de 39.6, una señal de bajo nivel positivo para dengue de serotipo 2 ARN. (B), Repetir la prueba del extracto A después de 1 ciclo de congelación-descongelación (de -20°C), mostró una elevación de la Ct de 40.8, indicando también una baja concentración del ARN presente. El tiempo real normal del producto PCR es visto como una gráfica sigmoidea. El valor de Ct es donde la señal de la curva sigmoidea (indicando acumulación del producto PCR de dengue específico) cruza el umbral (línea horizontal verde) indicando un resultado positivo. El umbral para las curvas individuales puede ser diferente y puede ser automáticamente establecido por el software de ensayo, pero también puede ajustarse dependiendo de la epidemiología del virus local del dengue y los valores esperados de Ct para resultados positivos en el caso específico de esta población de pacientes. NTC, sin plantilla de control.

eran responsables de la fiebre y la el malestar similar a la gripe. La donador fue examinada serológicamente 15 días después se reportó la aparición de las enfermedades de dengue y virus Epstein-Barr IBM e IgG así como influenza A y B, parainfluenza tipos 1–3, adenovirus, y virus sincitial respiratorio. Todos los resultados de las pruebas de serología fueron negativos.

Cuando aparecen productos sanguíneos, es importante para los clínicos tener la disponibilidad de distinguir una posible carga viral de bajo nivel en el producto sanguíneo trasfundido de un evento de bajo nivel de contaminación cruzada en el laboratorio. El caso que reportamos inicialmente sugirió la presencia de un ARN de dengue de bajo nivel en el producto sanguíneo, el cual atrajo nuestra atención solo cuando la donadora llamo al hospital 2 días después de la donación de sangre para reportar la fiebre.

Hay muchas razones posibles para la discrepancia de los resultados del PCR. La posibilidad más obvia es que deben de haber 2 sucesos de contaminación de bajo nivel de ARN de dengue del ensayo de PCR cuando el extracto A fue probado las primeras 2 veces. Tal contaminación siempre es posible en un laboratorio molecular y puede ser difícil de excluir. Dos operadores diferentes realizaron estas 2 primeras pruebas de PCR de ARN de dengue para el extracto A.

Una explicación alternativa es el bajo número de copias del ARN de dengue sugerido por la señal de PCR [umbral de ciclo (Ct) número de 39–40], una numero de copia que es virtualmente en nuestro límite definido de sensibilidad clínica para este ensayo en casa. Con tal número de copia con ARN bajo en la muestra original, los efectos estocásticos se vuelven importantes, y es posible omitir recoger con la pipeta el objetivo del ARN para ser amplificado. De una muestra de plasma de 500–1000 μL , solo 200 μL es usado en el proceso de extracción de ARN. De este volumen de la muestra se obtienen 50 μL conteniendo ARN, y de ésta solo se utiliza 1 μL para la reacción PCR. Es posible que cuando hay números de copias de ARN muy bajas en la muestra original, incluso después de concentrar el ARN dentro de 50- μL de volumen de elución, insertando la pipeta dentro de este volumen para remover solo 1 μL podría no tener ARN dentro de la punta de la pipeta. Este tipo de potencial “perdido” es un fenómeno estocástico que ha sido bien descrito anteriormente (4).

También se sabe que el proceso de congelación y descongelación decrece las cantidades de ARN intacto en muestras (5). El extracto A fue congelado y descongelado dos veces (a $-20\text{ }^\circ\text{C}$), el extracto B fue congelado y descongelado una vez (a $-20\text{ }^\circ\text{C}$), y el extracto C fue obtenido del plasma original que fue congelado y descongelado una vez (a $-80\text{ }^\circ\text{C}$).

PUNTOS PARA RECORDAR

- La prueba PCR es una técnica muy sensible que permite usar pequeñas cantidades de ARN o ADN para ser amplificado a más de un millón de veces. Así cualquier nivel bajo de contaminación (por ejemplo, para un control positivo) podría ser también amplificado.
- La contaminación debería ser monitoreada mediante la colocación de varios controles negativos en cada ejecución de PCR. Si alguno de estos controles negativos da una señal positiva, la corrida completa debe ser considerada como inválida.
- La re extracción de la muestra original (la cual debe mantenerse hasta que toda prueba esté completa satisfactoriamente) es obligatoria si se sospecha un resultado falso-positivo.
- No todos los resultados bajo-positivo son necesariamente falso positivos, y puede de hecho ser una baja concentración de ARN o ADN en la muestra. Para infecciones virales agudas (en contraposición a lo persistente o crónico), tomar una segunda muestra del paciente para volver a probar puede que no resuelva el problema porque la mayoría de las cargas virales decrecerán progresivamente de la fecha de aparición de la enfermedad debido a la eliminación del virus por inmunidad mediada.
- Repetir la prueba en el extracto original (o en un nuevo extracto de la muestra original) de una muestra verdadera de bajo positivo podría dar subsecuentemente un resultado negativo debido a la degradación de ARN o ADN después de congelar o descongelar.
- En situaciones en las cuales una enfermedad inesperada se desarrolla tanto en el receptor o en la donadora del producto sanguíneo, cuando la infección se sospecha, ambas muestras aguda y convaleciente (tomadas por lo menos de 10 a 14 días después) deben ser tomadas por serología paralela, PCR y/o cultivo.
- Durante estas investigaciones de laboratorio adicionales, el manejo del paciente debe ser cercanamente coordinado con el diagnostico de laboratorio para evitar el uso no necesario de potentes drogas antivirales o perdiendo la ventana de oportunidad para el tratamiento necesario.

Todos los resultados de la prueba de serología convaleciente para varios virus probados fueron negativos en la donadora. Si es posible que los síntomas reportados fueran debido a los comunes rinovirus o coronavirus más comunes, para los cuales la prueba de PCR no se ejecutó durante la etapa de enfermedad aguda y por lo cual la prueba serológica no estaba disponible para determinar infección de un pasado reciente con

esos patógenos. Dados los resultados negativos de esta prueba convaleciente en la donadora, por tanto es algo probable que los resultados de la prueba de PCR de ARN de dengue resulten doble-positivos. (como se observa en la Fig. 1) donde probablemente se debe a un evento de contaminación cruzada en lugar de una baja cantidad de ARN de dengue en esta muestra. Una prueba más de la falta de transmisión de dengue al neonato fue dada por resultados negativos en dengue IgM e IgG en suero convaleciente tomado del neonato 4 semanas después del evento de transfusión.

Nosotros sospechamos que la fuente de la contaminación cruzada podría haber venido del control de dengue 2 positivo, porque algunas otras muestras fueron positivas (hubo 1 por cada tipo de dengue 1, 2 y 3) durante esta semana. A pesar de que nosotros recibimos alrededor de 10 a 20 muestras por semana para las pruebas PCR de dengue, solo cerca del 10–15% podrían ser positivas en cualquier semana, y estas muestras son usualmente una mezcla de dengue 1 y 2, aunque se hayan observado, ocasionalmente, muestras de dengue 3 y 4. No cuantificamos por rutina el dengue en estas muestras positivas, pero la Ct puede variar de 25–35, en rango (con un punto de corte clínico establecido arbitrariamente en una Ct de aproximadamente 39–40, basado en nuestra experiencia de exámenes locales de casos clínicos de dengue, muchos de los cuales se han confirmado en una prueba paralela serológica).

En este caso, el contacto inicial de la donadora cuando se convirtió en sintomático, además de su voluntad de cooperar con las pruebas de seguimiento, nos permitió resolver este caso de manera satisfactoria. Se han puesto en marcha medidas para evitar la repetición de esta situación, incluyendo una revisión y un cuidadoso estudio de los protocolos estándar de operación con los miembros del personal que habitualmente realiza esta prueba particular de PCR de dengue.

Con la prueba PCR en tiempo real convirtiéndose más y más rutinaria en los hospitales, es importante distinguir en muestras clínicas cantidades verdaderamente bajas de patógenos de contaminación cruzada del laboratorio. Durante cualquiera de estas investigaciones y hasta que el problema sea resuelto, la posibilidad de tales resultados potenciales de falso-positivo

debe ser considerada en el proceso del manejo del paciente en curso. Tales resultados podrían llegar a ser verdadero positivos, y estando atentos con ellos se asegura que cualquier oportunidad para la intervención óptima no se haya perdido.

Contribuciones del autor: Todos los autores confirmaron que han contribuido con el contenido intelectual de este documento y han acordado los siguientes 3 requerimientos: (a) contribuciones significantes a la concepción y diseño, adquisición de datos, o el análisis e interpretación de datos; (b) la redacción o revisión el artículo para el contenido intelectual; y (c) aprobación final del artículo publicado.

Revelaciones de los autores de potenciales conflictos de interés: Sobre la sumisión del manuscrito, todos los autores completaron la forma de Revelaciones de Potencial Conflicto de Interés. Potenciales conflictos de interés:

De empleo o liderazgo: No declarado.

Rol consultante o de asesoramiento: No declarado.

Propiedad de repertorio: No declarado.

Honorarios: No declarado.

Financiación de la investigación: P.A. Tambyah, Baxter y Sanofi-Pasteur.

Testimonio experto: No declarado.

Otra remuneración: P.A. Tambyah, Novartis.

Papel del patrocinador: Las organizaciones patrocinadoras no representaron papel alguno en el diseño del estudio, elección de los pacientes inmiscuidos, revisión. Y

Agradecimientos: Agradecemos a la madre del neonato y a la donadora de sangre por su cooperación en esta investigación.

Referencias

1. Wilder-Smith A, Chen LH, Massad E, Wilson ME. Threat of dengue to blood safety in dengue-endemic countries. *Emerg Infect Dis* 2009;15:8–11.
2. Tambyah PA, Koay ESC, Poon MLM, Lin RVTP, Ong BKC. Dengue hemorrhagic fever transmitted by blood transfusion. *N Engl J Med* 2008;359:1526–1527.
3. Tan FL, Loh DL, Prabhakaran K, Tambyah PA, Yap HK. Dengue haemorrhagic fever after living donor renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:447–448.
4. Katsoulidou A, Moschidis Z, Sypsa V, Chini M, Papatheodoridis GV, Tassopoulos NC, et al. Analytical sensitivity and clinical sensitivity of the Procleix Ultrio HIV-1/HCV/HBV assays in samples with a low viral load. *Vox Sang* 2007;92:8–14.
5. Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, et al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis* 2006;193:387–395.

Comentario

Lynne Uhl

A raíz del reconocimiento de la transfusión transmitida de VIH, la comunidad del banco de sangre introdujo una mayor proyección en las donaciones, prueba mejorada al donador, y modificación post donación al producto para mejorar la seguridad del suministro de

sangre y reducir el riesgo de infección por transfusión transmitida (TTI). En adición a las preguntas de selección múltiple de la pre donación, en países desarrollados las unidades recogidas se someten a un examen de laboratorio, que incluye la prueba de ácido nucleico

para el virus de VIH/hepatitis C, y los más recientes hepatitis B y el virus del Nilo Oeste. Consecuentemente, el riesgo de TTI se ha reducido a niveles variando del 1/200 000 a 1/1–2 millones de episodios de transfusión.

A pesar de este decrecimiento en el riesgo, es necesaria la vigilancia permanente de las nuevas enfermedades potencialmente infecciosas transmisibles a través de transfusión de sangre (1). Como señaló Tang et al., el agente arbovirus responsable por la fiebre del dengue es ampliamente endémico en regiones ecuatoriales y hay evidencia acumulada para el riesgo de transfusión transmitida de la infección del dengue. Actualmente, de cualquier modo, ninguna buena selección de preguntas ha formulado la identificación de los donadores en gran riesgo de TTI de dengue asociado, ni hay una prueba aceptable de análisis de la donación que pueda ser aplicada prácticamente (1). Consecuentemente, la comunicación post donación por la donación de sangre de su enfermedad dentro de los 7 días posteriores es crítico, como fue evidenciado por este reporte del caso. Una vez que es presentada la facilidad de recolección de sangre con esta información, les corresponde a ellos determinar el riesgo de TTI, a pesar de la baja especificidad de fiebre para un potencial TTI. En la mayoría de los casos, las facilidades para las recolecciones de sangre siguen el principio precautorio y se trata de impedir la liberación de los componentes de la sangre mediante el inicio de un retiro de mercado (2). En respuesta, el servicio de transfusión muestra su inventario para determinar la disposición del producto sanguíneo implicado. Si sigue en inven-

tario, el producto sanguíneo es inmediatamente puesto en cuarentena hasta que la información adicional de la muestra está disponible considerando la seguridad para la distribución. Si el producto fue liberado por transfusión, está la posibilidad de alertar al servicio de transfusión para informar al médico del receptor considerando el riesgo de TTI y trabajando con el médico para desarrollar un plan de acción para mayor evaluación y manejo del paciente. Este reporte de caso ilustra la importancia del trabajo en equipo coordinado entre la recolección de sangre, el departamento de medicina de laboratorio, y el servicio clínico en evaluación del riesgo de TTI asociado con un componente de la sangre por los que se expresó preocupación.

Contribuciones del autor: Todos los autores confirmaron que han contribuido con el contenido intelectual de este documento y han acordado los siguientes 3 requerimientos: (a) contribuciones significantes a la concepción y diseño, adquisición de datos, o el análisis e interpretación de datos; (b) la redacción o revisión el artículo para el contenido intelectual; y (c) aprobación final del artículo publicado.

Revelaciones de los autores de potenciales conflictos de interés: Ningún autor declaró cualquier conflicto de interés.

Papel del patrocinador: Las organizaciones patrocinadoras no representaron papel alguno en el diseño del estudio, elección de los pacientes inmiscuidos, revisión e interpretación de datos, o la preparación o aprobación del manuscrito.

Referencias

1. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR, Dodd RY. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009;49:15–29S.
2. Ramsey G. Managing recalls and withdrawals of blood components. *Transfus Med Rev* 2004;18:36–45.

Beth Israel Deaconess Medical Center/Harvard Medical School, Boston, MA. Dirección de correspondencia del autor: Beth Israel Deaconess Hospital YA-309, 330 Brookline Ave, Boston, MA, 02215. Fax 617-667-4533; e-mail luhl@bidmc.harvard.edu.

Comentario

Roger Y. Dodd

Desafortunadamente, la sensibilidad incrementada del diagnóstico clínico está a expensas de la especificidad del diagnóstico clínico. En adición, las pruebas con alta sensibilidad analítica son susceptibles a la contaminación en el laboratorio. Además, está claro que las prue-

bas sensitivas diagnóstica y analíticamente son sujeto de resultados falso-positivos. En este caso, la preocupación sobre las circunstancias alrededor un resultado positivo aparentemente repetible para PCR de ARN de dengue 2 llevó a estudios más amplios y adecuados que apoyan firmemente la conclusión definitiva de que los resultados iniciales fueron de hecho, debidos a la contaminación. Un segundo y tercer extracto de la muestra original fue probado varias veces y se encontró no reactiva, y la evaluación de muestras subsecuentes para la evidencia de seroconversión provista de apoyo eviden-

Research and Development, American Red Cross, Rockville, MD. Dirección de correspondencia del autor: Research and Development, American Red Cross, Holland Laboratory, 15601, Crabbs Branch Way, Rockville, MD 20878. E-mail dodd@usa.redcross.org.

ció que la donadora no estaba infectada con el virus del dengue (y el receptor del neonato de su donación de sangre). El laboratorio no puede ser culpado de estas cuidadosas determinaciones, pero ¿han tenido lugar en un ambiente menos crítico? Aquí se encuentra la lección. De cualquier modo, una pregunta más amplia que podría hacerse y es ¿por qué la prueba fue hecha en primer lugar y cómo fueron elegidos los analitos? Dado el reciente encuentro de una transfusión y transmisión de dengue en Singapur, y la participación de algunos de los mismos autores en el caso, es incomprensible que el dengue y el virus de la chinkungunya fueron de interés, pero ¿hubo información clínica útil para proporcionar una base para las pruebas? ¿Cuál es la probabilidad de identificar con exactitud el agente etiológico de la gripa y la fiebre de este enfoque? ¿No podría haber sido una infección bacteriana o parasitaria, o de lo que habría tenido consecuencias muy diferentes para el receptor de la sangre? El caso ilustra que, a falta de precaución adecuada, las propiedades y los modos de fallos potenciales de las pruebas de sensibilidad podrían llevar a la

conclusión evidente de lo que se espera, en lugar de lo que en realidad está ahí.

Contribuciones del autor: *Todos los autores confirmaron que han contribuido con el contenido intelectual de este documento y han acordado los siguientes 3 requerimientos: (a) contribuciones significativas a la concepción y diseño, adquisición de datos, o el análisis e interpretación de datos; (b) la redacción o revisión el artículo para el contenido intelectual; y (c) aprobación final del artículo publicado.*

Revelaciones de los autores de potenciales conflictos de interés: *Sobre la sumisión del manuscrito, todos los autores completaron la forma de Revelaciones de Potencial Conflicto de Interés. Potenciales conflictos de interés:*

De empleo o liderazgo: No declarado.

Rol consultante o de asesoramiento: No declarado.

Propiedad de repertorio: R. Y. Dodd, Abbott Laboratories (miembro familiar inmediato).

Honorarios: P.A. Tambyah, Baxter y Sanofi-Pasteur.

Financiamiento de la investigación: No declarado.

Testimonio experto: No declarado.

Papel del patrocinador: Las organizaciones patrocinadoras no representaron papel alguno en el diseño del estudio, elección de los pacientes inmiscuidos, revisión e interpretación de datos, o la preparación o aprobación del manuscrito.