

VII. NAT y seguridad de la transfusión sanguínea

Rocío González-Díez*

Introducción

Ofrecer sangre lo más segura posible es una de las principales preocupaciones de los profesionales ligados a la transfusión. El objetivo de esta revisión es actualizar el papel que dicha tecnología de detección de ácidos nucleicos (NAT), aporta ó puede aportar en la reducción del riesgo de transmisión de agentes infecciosos.

El riesgo de transmisión de los virus de mayor relevancia clínica, VIH, VHB y VHC a través de la sangre es muy bajo con los análisis serológicos realizados habitualmente en los bancos de sangre, pero es la tecnología de detección de ácidos nucleicos (NAT), la que nos permite acercarnos al buscado riesgo cero, gracias a la detección directa de los virus en la fase de ventana serológica. Tampoco hay que olvidar la contribución a la seguridad transfusional aportada por los procedimientos de inactivación de patógenos, de securización del plasma, como la “cuarentena” y la desleucocitación de los componentes sanguíneos, de eficacia para virus intracelulares como el Citomegalovirus y a su vez, única opción preventiva de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vCJD).

La decisión de adoptar una nueva medida ó tecnología depende de muchos factores, que incluyen desde la presión política a la naturaleza de la enfermedad y su forma de transmisión y por supuesto, requiere de una valoración de beneficio/ coste.¹

Agentes transmisibles por la sangre: conocidos, nuevos y re-emergentes

Para que un agente infeccioso sea considerado una amenaza en la transfusión sanguínea debe de estar bien caracterizado, tener evidencias de que se transmite a través de la sangre transfundida y que produzca una enfermedad de relevancia clínica en el paciente transfundido.

Los principales virus conocidos implicados en infecciones postransfusionales son los de las hepatitis: VHB, VHC, VHA; Virus de la inmunodeficiencia humana: VIH 1 y 2; Virus de la leucemia de las células T humanas: HTLV 1y 2, Virus del Nilo Occidental, WNV y otros: Parvovirus B19, Citomegalovirus (CMV).

La contaminación por bacterias de la sangre es la mayor causa de infecciones transmitidas por transfusión, principalmente en plaquetas. Los gérmenes que con mayor frecuencia producen sepsis y muerte, incluyen la *Yersinia* y *Pseudomonas*, por transfusión de hematies, y *Staphylococcus*, *Serratia* y *Salmonella*, debido a las plaquetas. Los gram-negativos originan el mayor riesgo de muerte relacionada con transfusión.²

Los parásitos de mayor riesgo para la seguridad de la sangre son el *Tripanosoma cruzi*, causante de la Enfermedad de Chagas, varias especies de *Plasmodium* causantes del paludismo ó malaria y especies de *Babesia*, que producen babesiosis. Ocasionalmente se ha publicado la transmisión por transfusión de *Leishmanias*, en zonas endémicas y de helmintos, como microfilarias (*Wuchereria bancrofti*).

Pero además de los patógenos conocidos, la seguridad de la sangre sigue amenazada por la aparición de nuevos agentes infecciosos; estos pueden ser realmente “nuevos” o ya conocidos, pero no analizados rutinariamente y que en un momento determinado supongan una nueva o incrementada amenaza.³

Un agente puede emerger “de novo” por una mutación ó por que cruce la barrera de especies causando enfermedad en humanos. El VIH y vCJD son buenos ejemplos. Recientemente (2004) se ha publicado la posible transmisión por transfusión de sangre de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, causada por un prión.

En la última década se descubrieron los flavivirus (GBV-C/HGV), los circovirus como el virus TT (TTV), virus SEN (SEN_V) y el herpes virus tipo 8 (HHV-8). Aunque pueden ser transmitidos por transfusión no producen efectos adversos conocidos en los pacientes. Cabe citar, como emergentes que pudieran tener importancia en la transfusión sanguínea debido a su difusión en amplias zonas densamente pobladas, el Síndrome respiratorio agudo grave (SARS, 2002), causado por un coronavirus y la Gripe aviar (1997, 2003), producida por el subtipo H5N1 del género Influenza A.

Entre los re-emergentes se puede citar las bacterias, como un problema emergente debido al incremento en la transfusión de plaquetas. Por otra parte hay que considerar la introducción de agentes debido a los viajes y movimien-

* Banco Central de Sangre. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. México, D.F.

tos de migración de la población. Tal es el caso del *Tripanosoma cruzi* y *Plasmodium*. El WNV es otro ejemplo de agente re-emergente, pues era conocido y representaba un riesgo mínimo para la transfusión hasta que las condiciones ambientales han propiciado que su mosquito vector llegara a la población susceptible.

Escrutinio de agentes infecciosos en el banco de sangre.

Según se ha ido disponiendo de técnicas analíticas aplicables en los banco de sangre, se han analizado aquellos agentes infecciosos de trascendencia clínica y con una prevalencia en la población analizada, que conlleve riesgo.

Así, en la mayoría de los países desarrollados se estudia en cada donación la presencia del VHB, VHC y VIH 1+2 y sífilis. En algunos de estos países además, se estudia la presencia del WNV (2003) y del HTLV I/II.

Los test de escrutinio serológico se basan en la detección de proteínas virales (HBsAg en 1971, Ag p24 en 1996) y anticuerpos frente a proteínas de los virus (VHC en 1990, VIH1 en 1985, VIH-2 en 1992, HTLV/II 1989) y frente al *T. pallidum* en los 70.

La trascendencia de la transmisión de determinados patógenos por transfusión se debe a la no disponibilidad de tratamientos totalmente eficaces y al hecho de que donantes en apariencia sanos, pueden ser portadores de los mismos.

Riesgo estimado de transmisión por transfusión

En las últimas dos décadas se ha conseguido gran disminución en la transmisión de los principales virus por transfusión, debido en gran parte a los análisis realizados. Utilizando sólo técnicas serológicas, dicho riesgo se sitúa en un rango de 1/50.000 a una de cada 700.000 unidades de sangre para los principales agentes virales.⁴

Este riesgo permanece debido, principalmente, a cuatro causas: donaciones en periodo ventana ó preseroconversiones, variantes virales, seroconversiones atípicas y errores en el procesamiento del laboratorio.

El riesgo mayoritario de transmisión de virus a través de sangre donada es atribuido a las donaciones en periodo ventana (90%).

Las técnicas de biología molecular permiten la detección directa del material genético de los virus. Con las técnicas serológicas se detectan la mayoría de las donaciones con alguno de estos virus. Sin embargo, en el periodo ventana, es decir, en el intervalo de tiempo transcurrido desde la infección hasta que son positivos los análisis serológicos, es la aplicación de las técnicas NAT lo que permite detectar directamente los virus y disminuir ese riesgo potencial de transmisión.

Con la introducción de NAT, la reducción media estimada del periodo ventana sería de un 42% para el VHB (de 59 a 34 días), de un 27 a un 50% para VIH (de 22 a 11 días) y de un 62 a 65% para el VHC (de 66 a 23 días), conllevando esto una reducción proporcional del riesgo. Utilizando el modelo estadístico de estimación de riesgo "incidencia/ventana" se deduce que el riesgo de transmisión transfusional de los principales virus, antes de la implantación de la tecnología NAT, oscilaría, para el VIH, entre 1/400.000 en Italia y 1/3000000 en Australia; para la hepatitis C, entre 1/126.000 en Italia y 1/800.000 en Francia, y el riesgo de una hepatitis B se sitúa entre 1/57000 en Japón y 1/520.000 en Australia.⁵

Actualmente, el mayor riesgo infeccioso asociado a la transfusión es el asociado a bacterias, virus emergentes y parásitos, para los cuales los centros de transfusión no realizan pruebas de cribado rutinarias. Se estima que una de cada 100.000 plaquetas produce bacteriemia, con un desenlace fatal en la quinta parte de los casos.²

Tecnología NAT en banco de sangre

El punto de partida para su implantación, como parte del escrutinio de los componentes sanguíneos lábiles, fue el hecho de que, desde julio del 99, en Europa y norte de América se empezara el análisis de RNA del VHC en todos los "pool" de plasma empleados para el fraccionamiento industrial.

Las técnicas de biología molecular detectan secuencias genómicas específicas, con lo que se asegura una buena especificidad. Para ello el RNA ó DNA es capturado por sondas específicas. La sensibilidad se consigue con el proceso de amplificación del material genético.

Para su implantación en los bancos de sangre deben cumplir unos requisitos tanto económicos como de estandarización de las técnicas, con sensibilidad y especificidad adecuada y que permitan una logística de trabajo compatible con el objetivo de cubrir las necesidades transfusionales de los pacientes.

La tecnología NAT mayoritariamente empleada en los bancos de sangre se basa en la amplificación de la secuencia genética que se quiere detectar para su posterior revelado. Consta de tres pasos: extracción de los ácidos nucleicos, amplificación y detección de los amplicones.

Así, tenemos test comerciales semiautomáticos, cuya amplificación se basa en la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) ó en TMA (amplificación basada en la transcripción, TMA), cuya etapa de amplificación es isoterma. Con la PCR se produce gran número de copias de DNA virales que serán detectadas colorimétricamente (Cobas Ampliscreen, Roche Diagnostics), mientras que con la amplificación basada en la transcripción (Procleix y Ultrio, Gen-Probe Transcription-Mediated Amplification.Chiron

Corp.), se generan millones de copias de RNA, detectables por quimioluminiscencia. Ambos presentan muy buena sensibilidad, con límites inferiores a 100 copias/ml.⁶

La OMS ha ido desarrollado estándares de referencia internacional para los principales virus. Se trata de una concentración definida de unos determinados genotipos virales, expresada en UI. Esto ha sido esencial para la estandarización de los métodos y comparación de resultados entre diferentes laboratorios.⁷

La sensibilidad obtenida con esta tecnología NAT está dentro de los requisitos de la FDA en USA y el Consejo de Europa, de 5000 UI/ ml de VHC-RNA por donación.

La mayor sensibilidad la obtienen los que trabajan en muestra individual, si bien, esto tiene mayor trascendencia en los virus que se replican más lento, tal es el caso del VHB respecto al VHC ó VIH. En muchos bancos de sangre se analiza en "pool", entre 8 y 96 donaciones, lo cual abarata costes.

En cuanto a la logística de trabajo, se puede decir que en general no retrasa la disponibilidad de sangre analizada. Su implantación ha sido exitosa, basada en un buen entrenamiento del personal implicado, principalmente para prevenir la contaminación.

La proporción de tandas de trabajo inválidas es relativamente alto (2-8%). La industria sigue trabajando para conseguir una mayor automatización.

Estado de implantación de NAT para VHC, VIH, VHB y WNV

El VHC y VIH1 son analizados con NAT en las donaciones de sangre de muchos países de Europa, EEUU y Canadá, Australia, Japón, mientras que la detección directa del VHB ha sido excepcional (Japón, Alemania) hasta este año 2004 en el que la disponibilidad de NAT comerciales a incrementado su uso. La obligatoriedad de su empleo es mayor para el VHC que VIH. El WNV se ha implantado en EEUU en el 2003.⁶

La detección del VHA y parvovirus B19 está restringida, en varios países, al plasma utilizado por la industria farmacéutica para la obtención de hemoderivados.⁸

Rendimiento de las pruebas NAT en el cribado de las donaciones

El rendimiento del NAT varía en las distintas zonas geográficas, siendo proporcional a la incidencia y prevalencia de los marcadores en una población dada.

Después de un tiempo de experiencia con NAT y con unos 40 millones de donaciones analizadas para NAT-VHC y VIH en EEUU y otros 40 millones analizadas para NAT-VHC y 25 millones de NAT-VIH en Europa, se tienen datos

del rendimiento de NAT; 1 caso por 3 millones de donaciones para VIH y 1/270.000 para VHC. Estas tasas son 3-4 veces mayor entre donantes nuevos que repetidores.⁶

Conclusiones

1- El escrutinio de VHC y VIH1 por NAT, principalmente en mini pool, se está realizando o se realizará pronto, en la mayoría de los países ricos. Tras su implantación, el riesgo se ha reducido aproximadamente a 1 caso por 2 millones de transfusiones para el VHC y VIH 1. 2- El escrutinio de VHB-DNA se está empezando a implantar en varios países. Su mayor rendimiento se conseguirá en muestra individual respecto a pool, pues las técnicas HBsAg actuales son muy sensibles. 3- Las técnicas NAT más usadas en banco de sangre, se basan en la amplificación genómica de tipo PCR y TMA. Se utilizan de forma semiautomática, pero cumplen con los requisitos de estandarización, sensibilidad, especificidad adecuada y robustez. 4- La rápida disponibilidad de NAT para WNV, ha permitido identificar unos 1000 donantes infectados y por tanto, evitar la transmisión de otras tantas infecciones.

Perspectivas futuras

La mayor automatización permitirá el análisis de muestra individual con el consiguiente incremento en sensibilidad y "cierre del periodo ventana".

Los formatos "multiplex", permiten la detección de genomas de distintos agentes infecciosos en un único tubo lo cual simplifica el cribado de las donaciones.

Respecto a las bacterias, se están desarrollando métodos basados en la detección del DNA ó RNA ribosómico; que utilizan una región altamente conservada del rRNA bacteriano. Son rápidos pero la sensibilidad todavía es baja (10⁵ CFU/ ml). También se ha descrito una técnica multiplex de PCR para enterobacterias.

La rápida disponibilidad de esta tecnología NAT, demostrada con los 9 meses para el WNV, abre la esperanza de poder disponer de la misma para otros agentes emergentes.

Referencias

1. **Marshall DA, Kleinman SH, Wong JB, AuBuchon JP, Grima DT, Kulin NA et al.** Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sang* 2004; 86(1):28-40.
2. **Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, Gregory KR, Elder KV, Schreiber GB et al.** Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41(12):1493-1499.

3. **Alter HJ.** Emerging, re-emerging and submerging infectious threats to the blood supply. *Vox Sang* 2004; 87 Suppl 2:56-61.
4. **Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S.** Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000; 40(2):143-159.
5. **Hernández JM.** Riesgo residual de las enfermedades transmisibles por transfusión. *Boletín de SETS*. 2004.
6. **Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Sally C, Wright DJ et al.** Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing. *N Engl J Med* 2004;351(8):760-768.
7. **Tabor E, Epstein JS.** NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy. *Transfusion* 2002;42(9):1230-1237.
8. International Forum. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology. *Vox Sang* 2002;82:87-111.