

Virus Humano Herpes 8. ¿Despistaje en bancos de sangre?

Raúl Ortiz de Lejarazu¹
 María Ortega¹
 Francisco Padrón²
 Luis Ruiz¹
 Beatriz Hernández¹
 Cristina Labayru¹
 José M^a Eiros¹
 Antonio Rodríguez Torres¹

¹Servicios de Microbiología y
²Hematología
 Hospital Clínico Universitario de Valladolid

Correspondencia:
 Raúl Ortiz de Lejarazu
 Jefe de Sección de Virología
 2^a planta
 Hospital Clínico Universitario de Valladolid
 Ramón y Cajal, 3
 47011 Valladolid
 E-mail:
 lejarazu@med.uva.es

Resumen

Fundamento: Estudio serológico anónimo no relacionado para evaluar la prevalencia de infección por el Virus Herpes Humano 8 (VHH-8) en una muestra aleatoria de donantes de sangre.

Métodos: Se analizaron 424 sueros correspondientes a donantes de sangre. Se determinó la IgG frente a VHH-8 mediante EIA empleando la técnica de cribado en lotes de sueros. Como técnica de confirmación se utilizó una IFI en las muestras individuales de los lotes reactivos. Se seleccionaron de forma aleatoria analizándose también mediante IFI un 5% de las muestras individuales de sueros que formaban parte de lotes que resultaron negativos por el EIA de cribado.

Resultados: Del total de lotes analizados 2 fueron positivos mediante EIA (2,35%); dos muestras de estos lotes presentaron reactividades mediante IFI a las diluciones 1/50 y 1/100 respectivamente. Ninguna muestra de los lotes seleccionados aleatoriamente fue reactiva por IFI.

Conclusiones: La prevalencia en la población de donantes de sangre seleccionada fue del 0,47% (IC 95% 0,57-1,69) resultando altamente rentable el cribado por lotes de muestras. Dado el impacto que la donación de órganos tiene en España podría considerarse la posibilidad de cribado selectivo en donantes.

Palabras clave: Virus Herpes Humano-8. Donantes de sangre. Castilla y León.

Summary

Purpose: Anonymous non-linked serological study to assess the prevalence of antibodies to HHV-8 in a randomly selected blood donors population.

Methods: Serum samples from 424 blood donors were analyzed. With the selected samples pools of sera were made and subsequently screened for IgG to HHV-8 by means of an ELISA technique. Individual samples from reactive pools were retested by an indirect immune fluorescent (IFI) assay. A subgroup of 5% of individual samples randomly selected from non-reactive pools was also retested by IFI.

Results: Two out of 85 pools gave a positive ELISA result (2.4%), IFI confirmed those two individuals serum samples among the reactive pools for HHV-8 antibodies at serum dilutions of 1/50 and 1/100 respectively. None

of the individual serum samples randomly selected from non-reactive pools were reactive by the IFI assay.

Conclusions: The prevalence of HHV-8 infection among blood donors was 0.47% (CI 95% 0.57-1.69) and the screening using pools of sera was enough cost-effective. Given the great medical impact that organ donation has in Spain, the use of a selective screening for IgG to HHV8 in Spain should be considered.

Key words: Human herpesvirus 8. Blood donors. Castilla y León (Spain).

Introducción

El ADN del Virus Herpes Humano 8 (VHH-8) fue aislado en 1994 por Chang, *et al*¹ en muestras de una lesión cutánea pertenecientes a un paciente con infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana y Sarcoma de Kaposi (SK). Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han obtenido secuencias de ADN similares entre sí en diversas forma clínicas de SK, pacientes tanto que padecen la forma endémica africana, como la variedad mediterránea, así como en pacientes tras la realización de un trasplante²⁻⁵. El VHH-8 presenta una semejanza estructural al Virus Epstein Barr y ha sido clasificado junto con este, en la subfamilia Gammaherpesvirinae⁶.

El VHH-8, al igual que otros virus de la Familia Herpesviridae, se relaciona con infecciones persistentes en pacientes inmunodeprimidos⁷, entre los que cabe señalar por su incidencia, los pacientes con infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1). Los pacientes transplantados suponen un importante grupo tanto por tratarse de inmunodeprimidos, como por la posibilidad de transmisión de esta infección desde el donante por el órgano transplantado^{2,5,8,9} desde este punto de vista es reseñable la necesidad de delimitar el cribaje tanto en órganos como en las unidades de sangre a transfundir.

En la actualidad los métodos de diagnóstico utilizables para cribado en la práctica clínica son técnicas serológicas¹⁰⁻¹³. Existen diversas metodologías desarrolladas para la detección de anticuerpos frente al VHH-8, entre los que cabe destacar el Enzimoimmunoanálisis (EIA) y la Inmunofluorescencia indirecta (IFI). La Reacción en Cadena de la Polimerasa es la técnica relacionada con una mayor eficacia diagnóstica especialmente cuando está se realiza sobre muestras de las lesiones^{14,15}, pero de difícil aplicación a elevado número de muestras.

Los trabajos sobre seroprevalencia de esta infección son escasos y los porcentajes encontrados varían mucho de unas zonas geográficas a otras^{7,16}. Determinadas regiones del sur y centro de África poseen elevados índices de prevalencia mientras que zonas de Europa del Este y países mediterráneos presentan índices intermedios siendo la prevalencia en Asia, América del Norte y áreas del norte de Europa baja.

Por las razones expuestas se planteo un estudio serológico anónimo no relacionado con criterios de coste-eficacia para evaluar la prevalencia en una muestra de donantes de sangre de nuestro entorno geográfico y social respecto a la infección por el Virus Herpes Humano 8.

Material y métodos

Muestras

Se analizaron 424 sueros procedentes de donantes de sangre recogidos de la Unidad de Donantes de Sangre del Hospital Clínico Universitario de Valladolid. La selección de los sueros se realizó por un procedimiento aleatorio.

Técnicas de detección de IgG frente a VHH8

La detección de Inmunoglobulina G (IgG) frente al VHH-8 se realizó mediante la utilización de un proceso en dos pasos. Se utilizó un Enzimoimmunoanálisis (EIA) como técnica de despistaje (*VHH-8 IgG Antibody, Advanced Biotechnologies Inc, Maryland, USA*) para el cribado previo por lotes. La técnica de confirmación fue un test de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con células infectadas por VHH-8 (Human Herpes Virus 8 IgG Immuno-fluorescent Assay, Biotrin International Inc., Newton, USA) que se aplico a muestras individualizadas de suero. En ambos casos se siguieron las indicaciones del fabricante.

Enzimoimmunoensayo

El EIA empleado utiliza extracto solubilizado del VHH-8 incorporado a los pocillos de la microplaca como antígeno. Las muestras se analizaron a la dilución 1/100 y la incubación frente al antígeno se llevó a cabo a 37°C ($\pm 2^\circ$) durante 30 (± 5) minutos. Como conjugado se utilizó anti-inmunoglobulina humana (fragmento Fc) y la incubación se realizó en las mismas condiciones de tiempo y temperatura mencionadas (37°C/ 30 minutos). La incubación con el sustrato (tetrametilbenzimidida) transcurrió en oscuridad a temperatura ambiente, durante 30 (± 5) minutos. La reacción enzimática se paro con ácido sulfúrico 1N, y la lectura se realizó frente a un blanco mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 450nm. En cada reacción se incorporaron un control positivo por duplicado y uno negativo por triplicado proporcionados por el fabricante para la correcta valoración intraensayo de la reacción. Se consideraron positivos aquellas muestras cuya absorbancia fue superior a la media de la absorbancia de los controles negativos multiplicada por tres, según indicación del fabricante.

Inmunofluorescencia Indirecta

La técnica de Inmunofluorescencia Indirecta utiliza células infectadas por el VHH-8 (KS1) para la detección de IgG frente a proteínas tardías de VHH-8. Las muestras fueron testadas a las diluciones 1/20, 1/50 y 1/100. Las incubaciones para esta técnica se llevaron a cabo a 37°C durante 30 minutos. Como conjugado se utilizó anti-inmunoglobulina humana ligada a fluoresceína. La lectura se realizó mediante Microscopio de Fluorescencia. En cada ensayo realizado se incluyeron un control positivo y otro negativo para anticuerpos de clase IgG frente a VHH-8.

Procedimiento de lotes

Las muestras de suero de los 424 donantes se agruparon en lotes de 200 μ l constituidos por 40 μ l de cinco muestras de suero diferentes en cada lote. Todos los lotes fueron ensayados mediante EIA. Se retestaron mediante IFI todas las muestras de suero incluidas en cada lote que resultó reactivo en el cribado de anticuerpos por EIA. Para comprobar la validez de la estrategia de lotes utilizada, con objeto de minimizar la posibilidad de resultados falsos negativos por el efecto de dilución de muestra al utilizar la técnica de lotes, se seleccionó aleatoriamente una muestra compuesta por el 5% de los sueros individuales de aquellos lotes que habían resultado negativos que fueron analizados mediante Inmunofluorescencia indirecta de forma individualizada.

Cálculo de resultados

Los resultados se expresaron en porcentajes y sus respectivos Intervalos de Confianza del 95% (IC95%).

Resultados

De las 424 muestras de donantes se obtuvieron 84 lotes constituidos por cinco sueros y un lote constituido por cuatro sueros. El algoritmo de trabajo que se siguió se muestra en la Figura 1.

Del total de lotes de muestras de donantes de sangre (N=85) testados por EIA dos fueron positivos con absorbancias de 0,049 y de 0,061. Estos resultados suponen una reactividad general para la técnica de lotes del 2,4% sobre el conjunto ensayado (IC95%: 0,2-8,2%).

Al analizar los sueros que formaban cada uno de los lotes reactivos por EIA mediante la técnica de IFI aparecieron dos sueros de donantes de sangre con anticuerpos frente a VHH8. Uno de los sueros mostró reactividad específica a las diluciones 1/20 y 1/50 mientras que el otro mostró un título de anticuerpos superior a 1/100.

Los 21 sueros pertenecientes a lotes negativos mediante EIA y extraídos aleatoriamente (5% del conjunto de 424 sueros individuales de donantes) no mostraron ninguna reactividad. En ninguno de estos sueros se detectaron anticuerpos mediante IFI a la menor dilución ensayada (1/20).

Los resultados por lotes positivos y del estudio aleatorio de lotes negativos se muestran en la Tabla 1. Con estos datos la prevalencia de infección por VHH-8 encontrada en los donantes de sangre fue de 0,47% (IC95%: 0,57-1,69%).

Discusión

El despistaje de VHH8 en bancos de sangre no se realiza de forma rutinaria en España. En la actualidad es difícil encontrar un banco de sangre en el que se realice esta aproximación diagnóstica. El presente trabajo puede ayudar a hacer estimaciones previas sobre la prevalencia de Ac frente al VHH-8 en donantes de sangre mediante una técnica de lotes y despistaje por EIA. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran una baja prevalencia de portadores de anticuerpos frente al VHH-8 en nuestro medio, en este tipo de población. Este valor se sitúa entre 0,57% y 1,69%. Hasta donde conocemos no existe un estudio similar que determine este dato en España, aunque recientemente Gambus, *et al.*¹⁷ han publicado un estudio realizado en otras áreas geográficas diferentes a la nuestra. En los trabajos publicados se registran diferentes valores de prevalencia dependiendo de las áreas geográficas consideradas y analizadas^{7,16}. La prevalencia obtenida para nuestro medio se sitúa por debajo de la registrada en otros países del área Mediterránea¹⁸⁻²⁰, y por debajo de aquellas registradas en diversas zonas de EEUU²¹ e inferior a la documentada en el estudio español antes mencionado¹⁷. Si tenemos en cuenta el estu-

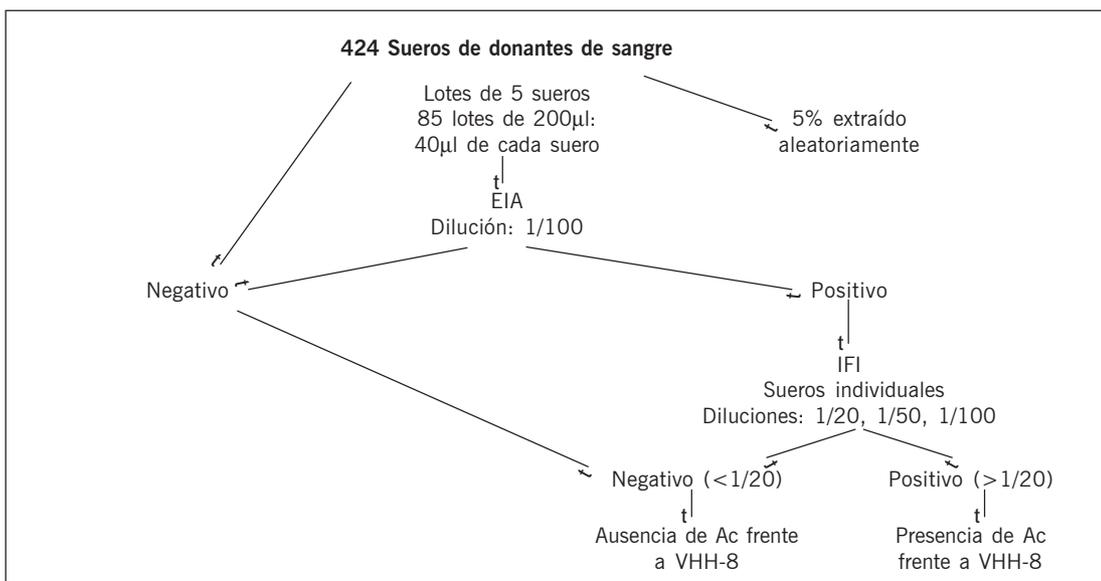


Figura 1. Algoritmo diagnóstico utilizado en la detección de IgG frente a VHH-8 en poblaciones con baja prevalencia

Tabla 1.
Detección de Ac frente
a VHH-8: resultados
obtenidos mediante
EIA e IFI

Tipo de muestra	N ensayados	N reactivos	EIA (absorbancia)	IFI IFI 1/20	IFI IFI1/50	IFI IFI1/100
Lote (5 sueros)	85	2	0,049 0,061	NE NE	NE NE	NE NE
Sueros de lotes reactivos	10	2	NE NE	+ +	+ +	NR +
Sueros extraídos al azar	21	0	NE	NR	NR	NR

NE: No ensayado; NR: No reactivo

dio multicéntrico realizado por Schatz, *et al.*²² en Europa y Uganda en el que fueron evaluados un total de 562 sueros entre los que se incluían muestras de donantes, la prevalencia en nuestro medio es inferior a la obtenida para Europa. La prevalencia encontrada en el presente trabajo es similar a la hallada en una cohorte de 1.431 individuos analizada en Francia por Challine, *et al.*²³ dentro del grupo denominado como de “baja prevalencia” compuesto por donantes, mujeres sanas embarazadas y multitransfundidos, que se corresponde con valores de prevalencia entre 0,0% y 5,0%, sin que estos autores lleguen a pronunciarse a favor o en contra de la necesidad de un cribado rutinario en bancos de sangre.

La estrategia de lotes ha sido utilizada en diferentes trabajos^{24,25}; ofrece varias ventajas técnicas entre la que cabe destacar la posibilidad de evaluar un mayor número de muestras en menor tiempo y con menor coste económico lo que posibilita aproximaciones como la ofrecida en el presente estudio. Es importante señalar que la utilización de la técnica de EIA para la detección de Ac frente al VHH-8 facilita la realización de este tipo de aproximaciones en lotes ya que permite un mejor manejo de las muestras y además puede ser automatizada. Esta técnica requiere una menor experiencia para la interpretación de los resultados que la IFI y es más objetiva. Los resultados obtenidos en este trabajo utilizando la estrategia de lotes han sido confirmados por la técnica de confirmación (IFI). El talón de aquiles de la técnica de lotes lo constituye el hecho de la pérdida de sensibilidad inherente a la dilución que experimenta cada suero en el conjunto del lote. Por ello además de las pruebas técnicas realizadas con anterioridad al estudio, se seleccionó al azar un porcentaje de sueros estadísticamente representativo del total de lotes analizados (5%) y se evaluó por la técnica de IFI, con el fin de determinar si existían muestras positivas que no hubieran sido detectadas por la técnica de EIA pudieran ser detectables por IFI en razón de una mayor sensibilidad. No se detectó ninguna muestra positiva adicional lo que demuestra

que el tamaño y diseño de lotes utilizado no merma la sensibilidad a la técnica de EIA empleada.

En nuestro estudio hemos llevado a cabo una aproximación a la detección de anticuerpos frente a VHH-8 en una población en la que cabe esperar una baja prevalencia de infección. La estrategia de lotes de cinco muestras y la técnica de EIA en donantes de sangre proporcionan una razonable exactitud de resultados en una población como la seleccionada. Esta metodología podría ser utilizada por bancos de sangre que quieran realizar un estudio prospectivo previo a la toma de decisiones definitivas. No se conocen las variaciones geográficas que puedan existir entre las diferentes regiones de España ya que no hay estudio completos. La prevalencia obtenida en este grupo fue de 0,47% y el uso de lotes de muestras resulta altamente rentable. Aunque la prevalencia es baja, dado el impacto que la donación de órganos tiene en España debería considerarse la posibilidad de cribado de anticuerpos VHH-8 en aquellas unidades de sangre destinadas a pacientes trasplantados u otros en los que la inmunosupresión vaya a prolongarse en el tiempo y pudiera posibilitar la aparición de patología relacionada con la adquisición de VHH-8.

Bibliografía

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, *et al.* Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994;266:1865-9.
2. Moore PS, Chang Y. Detection of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma in patients with and without HIV infection. *N Engl J Med* 1995;332:1181-5.
3. Drago F, Rebora A. The new Herpesviruses. Emerging pathogens of dermatological interest. *Arch Dermatol* 1999;135:71-5.
4. Luppi M, Barozzi P, Schulz T, *et al.* Bone marrow failure associated with Human Herpesvirus 8

- infection after transplantation. *N Engl J Med* 2000; 343:1378-85.
5. Regamey N, Tamm M, Wernli M, Witschi A, Thiel G, Cathomas G, Erb P. Transmission of Human Herpesvirus 8 infection from renal-transplant donors to recipients. *N Engl J Med* 1998;339:1358-63.
 6. Moore PS, Gao SJ, Domínguez G, et al. Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *J Virol* 1996;70:549-58.
 7. Antman K, Chang Y. Kaposi's Sarcoma. *N Engl J Med* 2000;342:1027-38.
 8. Lesnoni La Parola I, Masini C, Nanni G, Diociaiuti A, Panacchia N, Cerimele D. Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients: experience at the Catholic University in Rome, 1988-1996. *Dermatology* 1997; 194:229-33.
 9. Shepherd FA, Maher E, Cardella C, et al. Treatment of Kaposi's sarcoma after solid organ transplantation. *J Clin Oncol* 1997;15:2371-5.
 10. Engels EA, Whitby D, Goebel PB, et al. Identifying human herpesvirus 8 infection: performance characteristics of serologic assays. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000;123:346-54.
 11. Chatlynne LG, Lapps W, Handy M, et al. Detection and titration of Human Herpesvirus-8-specific antibodies in sera from blood donors, Acquired Immunodeficiency Syndrome patients, and Kaposi's Sarcoma patients using a whole virus enzyme-linked immunosorbent assay. *Blood* 1998;92:53-8.
 12. Topino S, Vincenzi L, Mezzaroma I, Mezzaroma I, Nicastrì E, Andreoni M, Sirianni MC. Correlation between enzyme-linked immunosorbent assay and immunofluorescence assay with lytic antigens for detection of antibodies to human herpesvirus 8. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:203-5.
 13. Lennette ET, Blackburn DJ, Levy JA. Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients. *Lancet* 1996;348: 858-61.
 14. Whitby D, Howard MR, Tenant-Flowers M, et al. Detection of Kaposi sarcoma associated herpesvirus in peripheral blood of HIV-infected individuals and progression to Kaposi's sarcoma. *Lancet* 1995;364: 799-802.
 15. Moore PS, Kingsley LA, Holmberg SD, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection prior to onset of Kaposi's sarcoma. *AIDS* 1996;10:175-80.
 16. Moore P. The emergence of Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus (Human Herpesvirus 8). *N Engl J Med* 2000;343:1411-3.
 17. Gambus G, Bourboullia D, Esteve A, et al. Prevalence and distribution of HHV-8 in different subpopulations, with and without HIV infection, in Spain. *AIDS* 2001; 15:1167-74.
 18. Perna AM, Bonura F, Vitale F, et al. Antibodies to human herpes virus type 8 (HHV8) in general population and in individuals at risk for sexually transmitted diseases in Western Sicily. *Int J Epidemiol* 2000;29: 175-9.
 19. Juhasz A, Remenyik E, Konya J, et al. Prevalence and age distribution of human herpesvirus-8 specific antibodies in Hungarian blood donors. *J Med Virol* 2001;64:526-30.
 20. Crispo A, Tamburini M, De Marco MR, et al. HHV-8 prevalence, immunosuppression and Kaposi's sarcoma in South Italy. *Int J Mol Med* 2001;7:535-8.
 21. Baillargeon J, Deng JH, Hettler E, et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection among blood donors from Texas. *Ann Epidemiol* 2001; 11:512-8.
 22. Schatz O, Monini P, Bugarini R, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus serology in Europe and Uganda: multicentre study with multiple and novel assays. *J Med Virol* 2001;65:123-32.
 23. Challine D, Roudot-Thoraval F, Sarah T, et al. Seroprevalence of human herpes virus 8 antibody in populations at high or low risk of transfusion, graft, or sexual transmission of viruses. *Transfusion* 2001;41: 1120-5.
 24. Quinn TC, Brokmeyer R, Kline R, Shepherd M, Paranjape R, Mehendale S. Feasibility of pooling sera for HIV-1 viral RNA diagnose acute primary HIV-1 infection and estimate HIV incidence. *AIDS* 2000; 14:2751-7.
 25. Ortiz de Lejarazu R, Eiros JM, Almaraz A, Castrodeza J, Martín FJ, Rodríguez Torres A. HIV antibodies in a hospital emergency unit. Detection through system of pooled batches. *Rev Clin Esp* 1992;191:468-72.