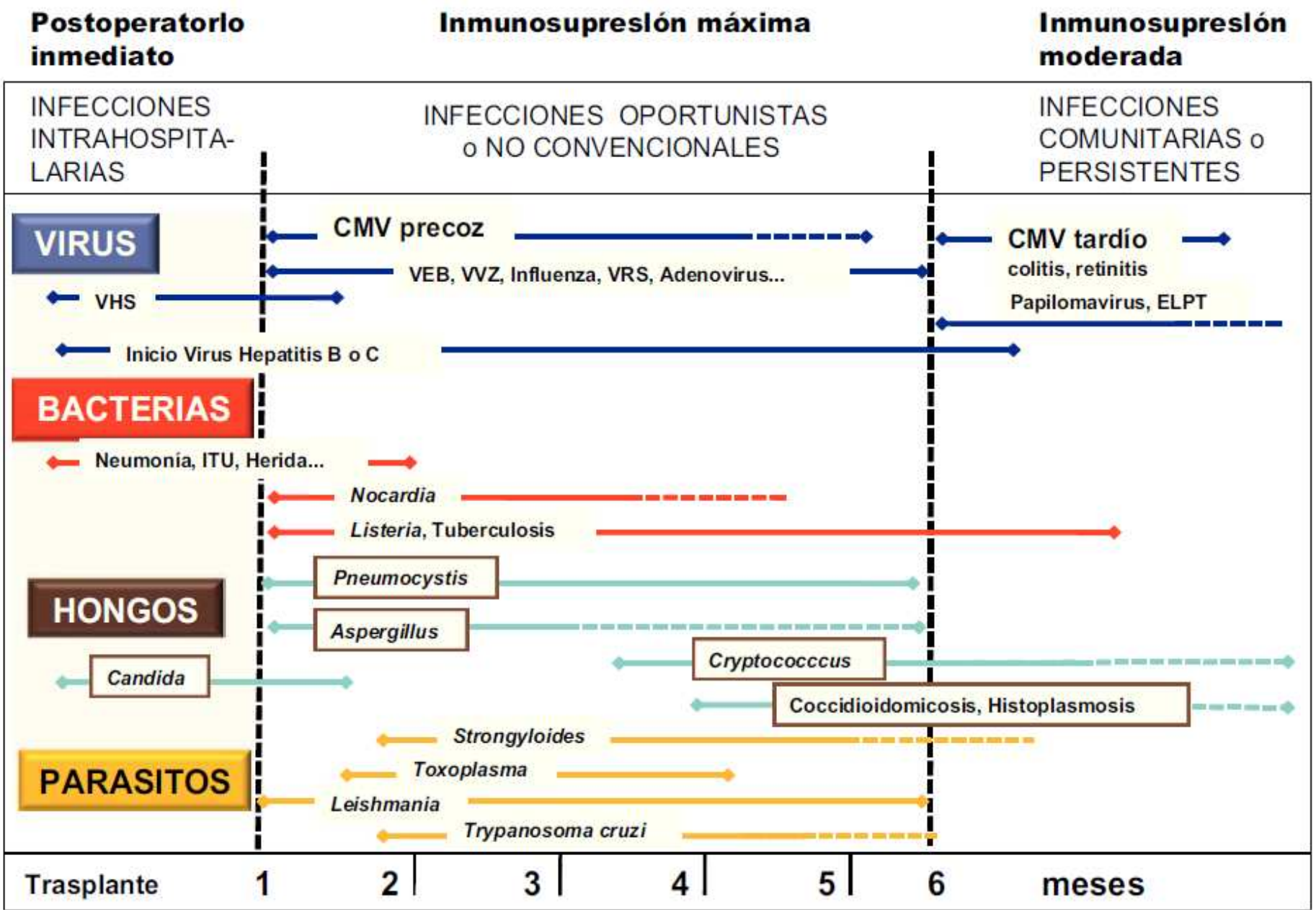
ANEMIA DE ORIGEN INFECCIOSO EN TRASPLANTADO RENAL

Javier Coy . R-4 de Microbiología

Carla Gosálvez. R-2 de Microbiología

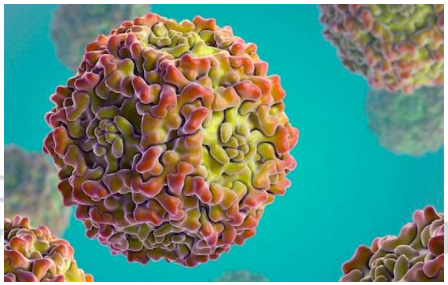
Colabora: Pilar González de la Aleja. R-5 de Medicina interna

TRASPLANTE DE ÓRGANO SOLIDO



ORIGEN DE LAS INFECCIONES VIRALES

- Órgano trasplantado
- Medio ambiente y entorno del paciente
- Reactivaciones de infecciones antiguas del propio paciente



MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE LAS INFECCIONES VIRALES

- Serología
  - Presencia de IgM o seroconversión se asocia a primoinfección viral
  - Poca utilidad en determinados pacientes inmunodeprimidos y en reactivaciones virales

- Cultivos celulares
  - Proceso complejo y lento
  - No se realiza en la practica clínica habitual

Métodos complementarios

- Microbiología molecular
  - Detecta la presencia del genoma del patógeno
  - Técnica muy sensible: detecta cargas virales bajas
  - Los resultados deben interpretarse en función
    - de la clínica del paciente
    - del ciclo biológico del virus

GENERALITAT VALENCIANA Hospital General Universitari d'Alacant

CASO CLÍNICO

CASO CLÍNICO

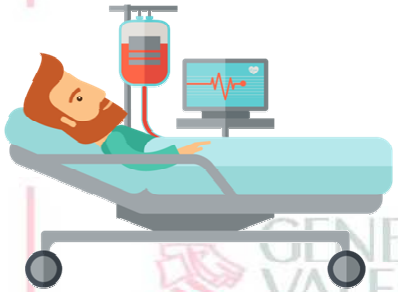
Varón de 52 años → disnea de mínimos esfuerzos y astenia asociada a palpitaciones desde hace una semana con empeoramiento en los dos últimos días. Llevaba vida activa y con ejercicio físico hasta hace dos días. No sudoración. Afebril en domicilio. No otros síntomas.

-Trasplante renal en 2010 por enfermedad renal crónica secundario a nefropatía IgA. En tratamiento con tacrolimus 4 mg/día y azatioprina 100 mg/día. Este último desde hace dos meses, modificado por molestias digestivas con micofenolato.
- Serología pretrasplante: CMV IgG(+); Toxoplasma IgG(-); VEB IgG(+);
-Tratamiento: Adenuric® 80 mg/día; Bisoprolol 2.5 mg/día; Enalapril 10 mg/día.

-Tª 36.8ºC. Hemodinamicamente estable. Palidez cutáneo-mucosa. Ausencia de lesiones cutáneas.
-Auscultación cardio pulmonar normal.
-Tacto rectal negativo

CASO CLÍNICO

-Coagulación: Quick 81% INR 1,15
-Bioquímica: **Cr 2,46 mg/dL** FG CKD-EPI 29 mL/min PCR 1,13 mg/dL
-Hemograma: **Leucocitos 2810 /µL** (N 1750/µL ; **L 750/µL;** M 130/µL)
Hb 5 g/dL (HTO 14,2%; VCM 88,2 fL HCM 31,1 fL) Plaquetas 146.000/µL
- Rx tórax: normal



Anemia y leucopenia en trasplantado renal

Ingreso a cargo de NEFROLOGIA

¿¿Toxicidad farmacológica??

CASO CLÍNICO

1

Fiebre de hasta 39ºC con muy buena tolerancia y sin focalidad infecciosa. No lesiones cutáneas. Exploración física sin cambios

1. Solicitan hemocultivos y urocultivos (-).
2. Inicia meropenem
3. Eco abdominal: no esplenomegalia.

SP: **Leucos 2350/µL (N 1430/µL; L670/µL) Hb 6,7 g/dL Plaquetas 147.000/µL**. (leve anispoiquilocitosis, no formas inmaduras, no hemolisis)

2

Aspirado de médula ósea

Sospecha clínica **(Inmunosuprimido Fiebre + citopenias):**

1. Anemia y leucopenia secundaria a toxicidad farmacológica (interacción febuxostat/azatioprina) → Suspendió Imurel®
2. Sangrado digestivo → no datos clínico, hemodinámicamente estable.
3. Infeccioso → PCR CMV negativa; IgG Parvovirus (+) e IgM (-) → aspirado médula ósea

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

CASO CLÍNICO

Medulograma: Serie roja normocelular. Secuencia madurativa conservada. Importantes signos **diseritropoyéticos en más 10%.** Serie granulomonocita normal. Linfocitos 2%. Plasmáticas 3% sin atipias.

Microbiología molecular MO: Carga viral VEB no se detecta. PCR leishmania negativa. **Parvovirus B19 PCR 1396 UI/mL**

Reactivación de Parvovirus B19 con anemia severa y leucopenia

Tratamiento:

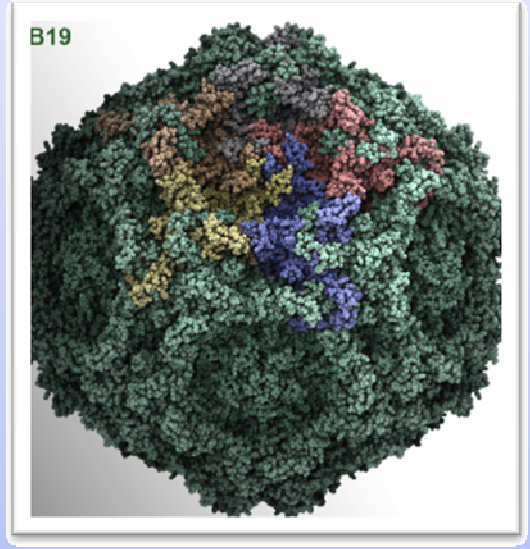
1.Inmunoglobulinas 5 Días

2.GCSF

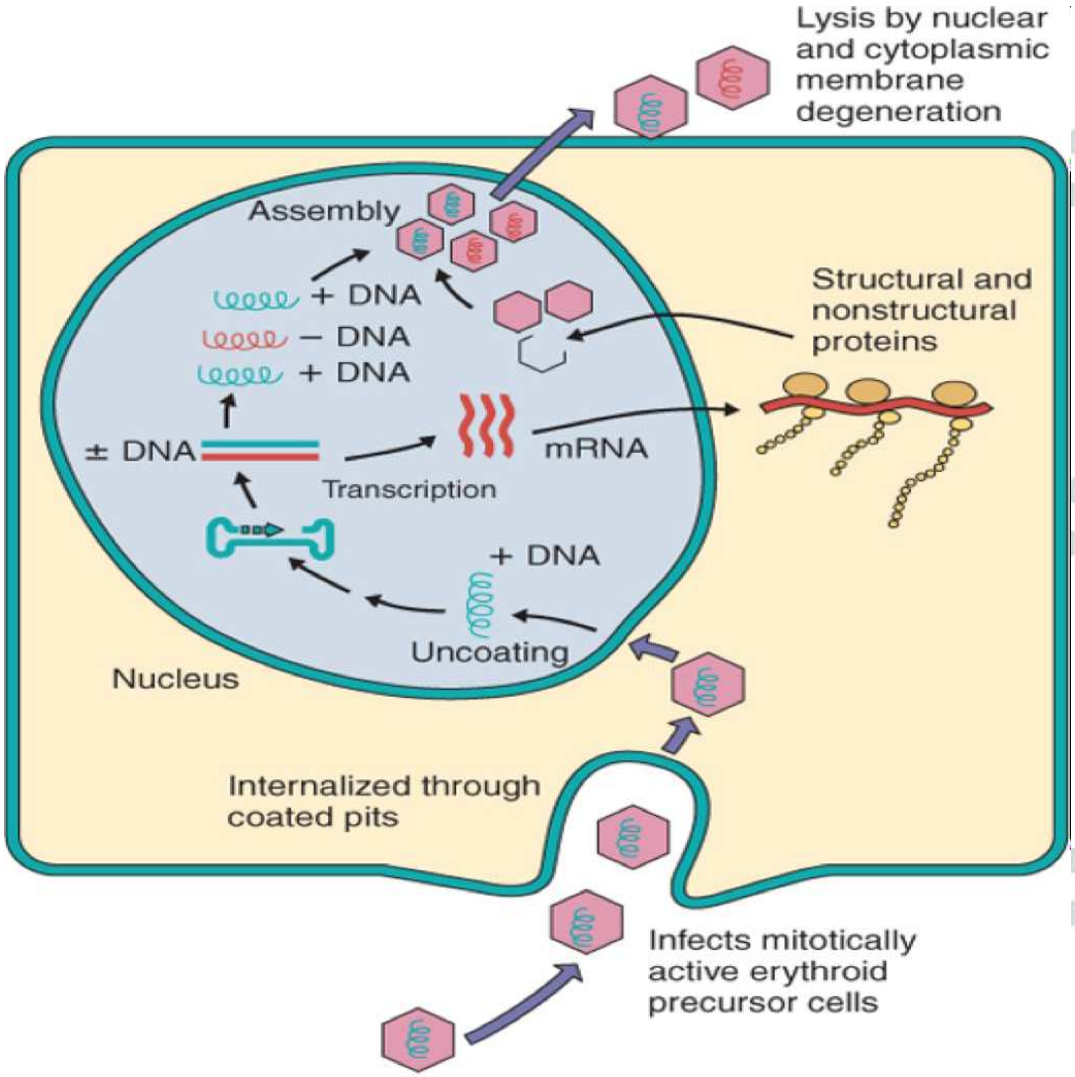
3.Ajustó inmunosupresión (mantuvo tacrolimus y suspensión de imurel e inicio de sirolimus)

PARVOVIRUS B19

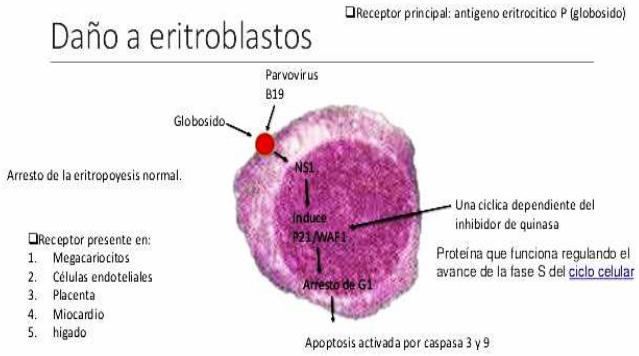
- DNA monocatenario y lineal
- Sin envoltura
  - Muy resistentes
- Virus muy pequeños (18-26 nm)
- Cápside icosaedrica
  - 2 proteínas estructurales (VP1 y VP2)
  - 1 Proteína no estructural citotóxica (NS-1)
- Se replican solo en células en <u>mitosis activa</u> (fase S)
  - No codifican elementos para estimular el crecimiento celular



CICLO BIOLÓGICO



- Entrada células mitosis activa
- Ciclo lítico



Hospital General Universitari d'Alacant

PREVALENCIA Y TRANSMISIÓN

- Distribución mundial: epidémica o esporádica
- Primoinfección: entre los 5 y los 15 años de edad (70%)

Edad	Prevalencia
< 5 años	2-20%
5-18 años	15-40%
> 18 años	40-80%

Epidemiología de la infección por B19

- Factores víricos
  - Cápside resistente a la inactivación
  - El periodo contagioso precede a los síntomas
  - El virus atraviesa la placenta e infecta al feto

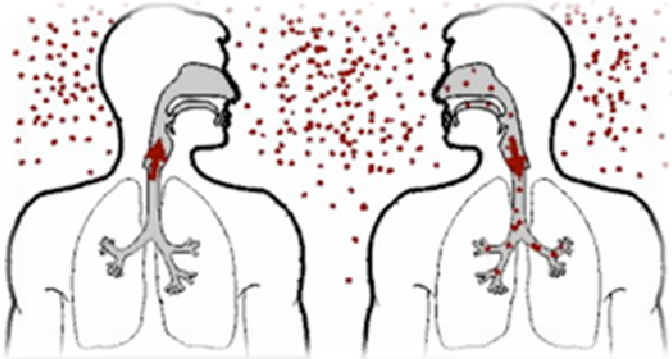
- Personas de riesgo
  - Niños (edad de escuela primaria)
  - Padres de niños infectados
  - **Mujeres embarazadas**
  - **Individuos con alteraciones hematológicas**

- Métodos de control
  - No existen

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

Riesgo de transmisión

- **Vía respiratoria**
- Sangre, hemoderivados, trasplante
- Materno-fetal
- Posible transmisión nosocomial



MANIFESTACIONES CLÍNICAS

TABLE 2 Major diseases caused by B19V infection

Disease(s)	Progression	Host(s)
Erythema infectiosum	Acute	Healthy children
Arthropathy	Acute or chronic	Healthy adults
Hydrops fetalis/fetal loss	Acute or chronic	Fetus
Transient aplastic crisis	Acute	Patients with a high rate of red blood cell turnover, e.g., sickle cell disease patients
Persistent infection and pure red cell aplasia	Chronic	Immunocompromised patients, e.g., HIV/AIDS or postchemotherapy patients

- *Gravedad de los síntomas varía ampliamente*
- *La mayoría de inmunocompetentes son asintomáticos*

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

- También se ha asociado a:
  - Manifestaciones cutáneas: púrpura vascular y trombocitopénica…
  - Hepatitis
  - Miocarditis
  - Pericarditis
  - Alteraciones neurológicas: encefalitis, meningitis…
  - Alteraciones autoinmunes
  - Fatiga crónica

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Tissue Type	B19V DNA Detection	Mean Genome Equivalents (ge)	Expression Methods	RNA Analysis	Protein Analysis	Serum IgG	Altered *in vivo* Gene Expression	Expression Associated with Disease	Reference
Bone Marrow	71/139 (51.1%)	1000 copies/ 10^5 cells	RT-PCR	2/24 (8.3%)	n/a	75/102 (73.5%)	n/a	no	Corcioli et al., 2008
Colon	71/82 (86.6%)	n/a	IHC	n/a	49/82 (59.8%)	n/a	n/a	yes, colon polyps and adenocarcinomas lesions	Li et al., 2007
Heart	15/30 (50.0%)	n/a	IHC	n/a	14/30 (46.7%)	n/a	n/a	no	Escher et al., 2008
Heart	505/1087 (46.5%)	84-709 ge/µg gDNA	RT-PCR	N.R.	n/a	n/a	Myocardial inflammation	yes, inflamed myocardium	Bock et al., 2010
Heart	60/60 (100.0%)	721±1221/ 370±478 copies/µg DNA	Quantitative RT-PCR	15/60 (25%)	n/a	n/a	Altertations in miRNA expression	yes, chest pain at rest, increased LVED	Kühl et al., 2012
Liver	14/49 (28.6%)	n/a	RT-PCR	3/16 (18.8%)	n/a	n/a	n/a	no	Karetnyi et al., 1999
Liver	27/121 (22.3%)	n/a	RT-PCR	0/16 (0%)	n/a	n/a	n/a	no	Wong et al., 2003
Liver	17/47 (36.2%)	n/a	nested RT-PCR	11/17 (64.7%)	n/a	n/a	n/a	no	Abe et al., 2007
Lymphoid cells	36/47 (76.6%)	n/a	IHC	n/a	23/49 (46.9%)	n/a	n/a	yes, idiopathic Kikuchi-Fujimoto disease	Zhang et al., 2007
Lymphoid cells	n/a	n/a	IHC	n/a	64/75 (85.3%)	n/a	Increased IL-6	no	Polcz et al., 2013
Skin	59/72 (81.9%)	100-70000ge/ 10^6 cells	RT-PCR	7/27 (25.9%)	n/a	n/a	n/a	yes, systemic sclerosis	Zakrzewska et al., 2009
Synovial cells	76/96 (79.2%)	n/a	IHC	n/a	32/98 (32.7%)	n/a	Increased IL-6 and TNFα (*ex vivo*)	yes, RA synovium with active synovial lesions	Takahashi et al., 1998
Testis	1/1 (100.0%)	n/a	IHC	n/a	23/30 (76.7%)	n/a	n/a	no	Polcz et al., 2012
Thyroid	93/112 (83.0%)	n/a	IHC	n/a	33/112 (29.5%)	n/a	Activated NF-κB	yes, papillary thyroid carcinoma	Wang et al., 2008
Thyroid	68/86 (79.1%)	n/a	IHC	n/a	21/86 (24.4%)	n/a	Activated NF-κB Increased IL-6	yes, Hashimoto's thyroiditis	Wang et al., 2010
Thyroid	n/a	n/a	IHC	n/a	29/35 (82.9%)	n/a	n/a	no	Adamson et al., 2011
Thyroid	n/a	n/a	IHC	n/a	24/64 (37.5%)	48/64 (75.0%)	n/a	no	Page et al., 2013
Thyroid	190/218 (87.2%)	680-2300 ge/µg gDNA	RT-PCR, IHC	51/76 (67.1%)	149/218 (68.3%)	n/a	n/a	no	Adamson et al., 2013

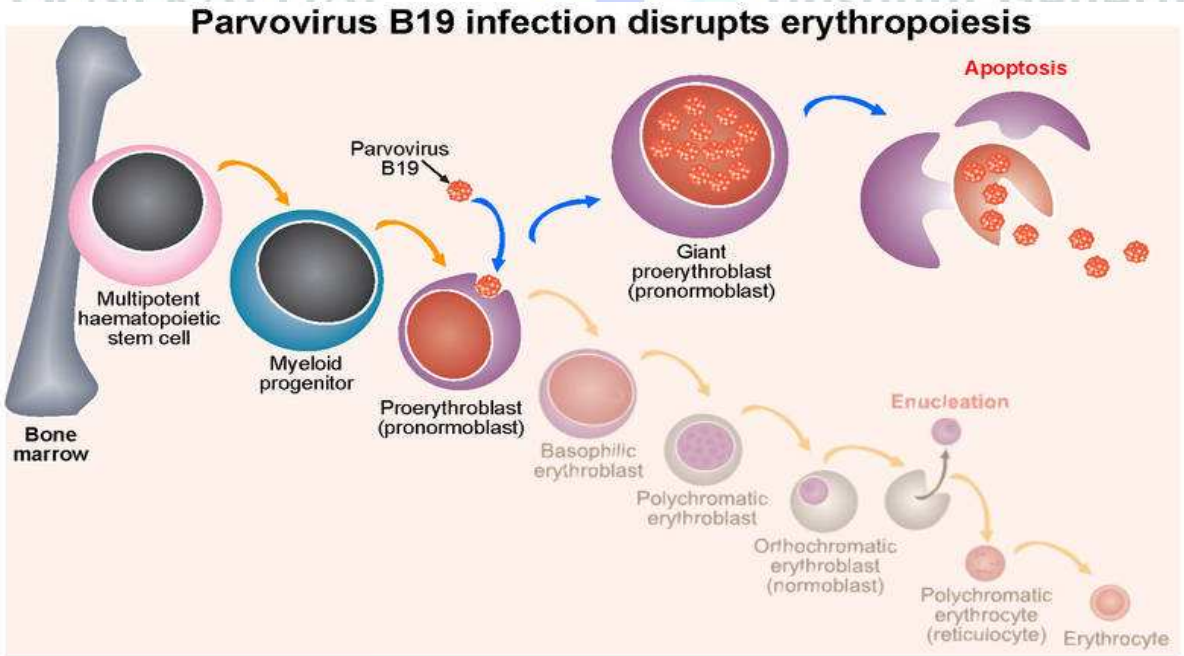
n/a = not applicable
N.R. = not reported
IHC=immunohistochemistry
RT-PCR= reverse transcriptase PCR
IL-6= Interleukin 6
TNFα=Tumor necrosis factor alpha
LVED=left ventricular end-diastolic diameter

Accepted Manuscript

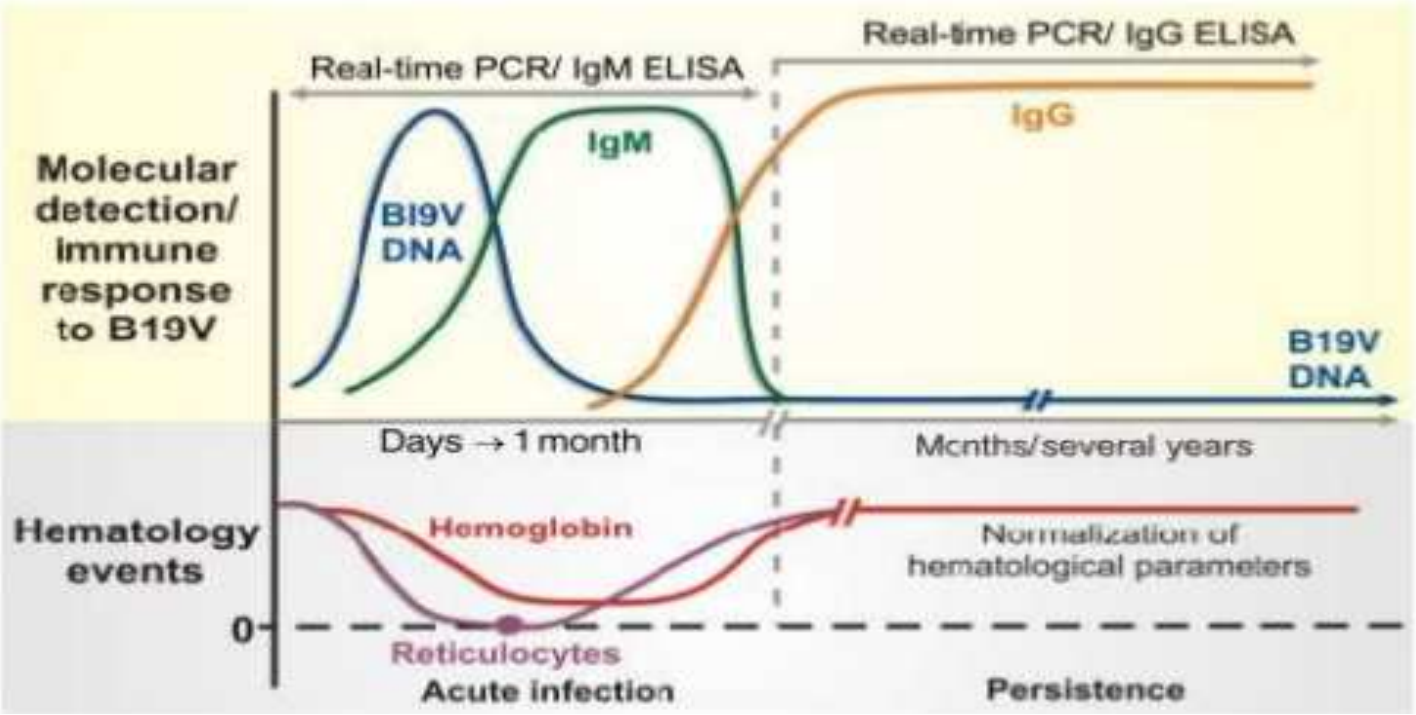
Fases de la PATOGENIA

•Evolución bifásica

1. Afectación células precursoras de hematíes
   - o Tropismo del B19 por células de línea eritroide en fase mitosis
   - o Replicación y ciclo lítico
   - o Inhibición de la eritropoyesis ➡ Anemia
2. Síntomas asociados a la respuesta inmune
   - o Formación de complejos inmunitarios ➡ Exantema, artralgia



Marcadores infección



- Viremia
  - Primer marcador que aparece
  - Desaparece rápidamente en la mayoría de los pacientes

- IgM:
  - primer Ac que aparece
  - se mantiene positivo durante unas cuantas semanas
- IgG:
  - Aparece después de la IgM
  - Se mantiene positiva de por vida

VIREMIA

La aparición de Ac hace descender la carga viral

Puede coincidir con la sintomatología

- **En pacientes inmunocompetentes:**
  - **Viremia muy corta (días)**
  - **Hasta que aparecen Ac**
  - **En paciente con Ac la viremia suele ser indetectable**

- En algunos pacientes puede mantenerse positiva a niveles bajos durante años en determinados órganos

- Enfermedades pulmonares crónicas:
  - se detecta durante años en m. respiratorias

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR PARVOVIRUS B19

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

Dx EN PACIENTES INMUNOCOMPETENTES

- La presencia de IgM se asocia a infección aguda (primoinfección)
- La IgG se mantiene constante toda la vida
- La viremia es muy corta: una vez hay Ac, no es útil su detección por PCR

	Viremia	IgM	IgG	Observaciones
No infección	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	
Infección muy reciente	POSITIVO / NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	Demostrar seroconversión de IgG
Infección reciente	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**POSITIVO**	**Situación habitual**
Infección antigua	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	

GENERALITAT VALENCIANA Hospital General Universitari d'Alacant

Un caso especial: VARIAS IgM POSITIVAS

- Infección reciente por varios virus
- Reacción cruzada
- Activación policlonal

→ Técnicas moleculares

Dx EN PACIENTES INMUNODEPRIMIDOS

- Primoinfección: la respuesta de anticuerpos puede estar alterada
- Reactivación: no suele aparecer IgM
- La detección de carga viral es el método recomendado

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

	Viremia	IgM	IgG	Observaciones
Infección antigua	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	
Reactivación o Persistencia	**VARIABLE POSITIVO (Médula ósea)**	**NEGATIVO**	**POSITIVO**	**Valorar con la clínica del paciente**
Infección reciente	**POSITIVA**	**VARIABLE**	**VARIABLE**	

DIAGNÓSTICO DE HYDROPS FETALIS

- La madre presenta infección aguda por parvovirus

	Cv Líquido amniótico	IgM	IgG	Observaciones
Madre	**POSITIVO**	POSITIVO	POSITIVO	
Niño		**POSITIVO**	POSITIVO	Valorar con la clínica del paciente

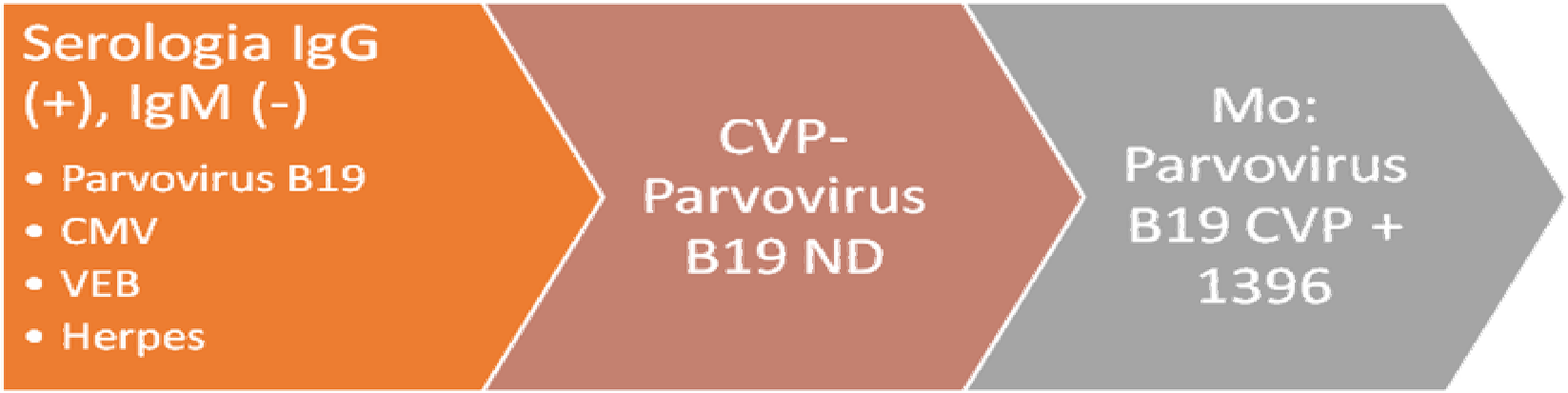
NUESTRO PACIENTE

- **PCR Plasma**
  - o CMV No se detecta
  - o Parv. B19 No se detecta
- **PCR médula ósea**
  - o VEB No se detecta
  - o CMV No se detecta
  - o Leishmania No se detecta
  - o Parv.B19 Se detecta 1396 UI/mL

- **Serologia**
  - o B. BUGDORFERI Ac totales NEGATIVO
  - o BRUCELLA-Rosa de bengala NEGATIVO
  - o BRUCELLA IG G NEGATIVO
  - o BRUCELLA IG M NEGATIVO
  - o CITOMEGALOVIRUS IG G POSITIVO
  - o CITOMEGALOVIRUS IG M NEGATIVO
  - o Ac. heterófilos V. Epstein-Barr NEGATIVO
  - o EPSTEIN BARR IG G POSITIVO
  - o EPSTEIN BARR IG M NEGATIVO
  - o PARVOVIRUS B19 Ig G POSITIVO
  - o PARVOVIRUS B19 Ig M NEGATIVO
  - o TOXOPLASMA GONDII Ig G NEGATIVO
  - o TOXOPLASMA GONDII Ig M NEGATIVO
  - o VIH 1+2 AC NEGATIVO
  - o Virus Hepatitis E IGG NEGATIVO
  - o Virus Hepatitis E IGM NEGATIVO

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

NUESTRO PACIENTE



GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

- Serología:
  - IgG positivo
  - IgM negativo
- Carga Viral:
  - Plasma negativo
  - Médula ósea: positivo
- Cuadro compatible

REACTIVACIÓN / PERSISTENCIA DE UNA INFECCIÓN ANTIGUA POR PARVOVIRUS ASOCIADA A LA INMUNODEPRESIÓN DEL PACIENTE

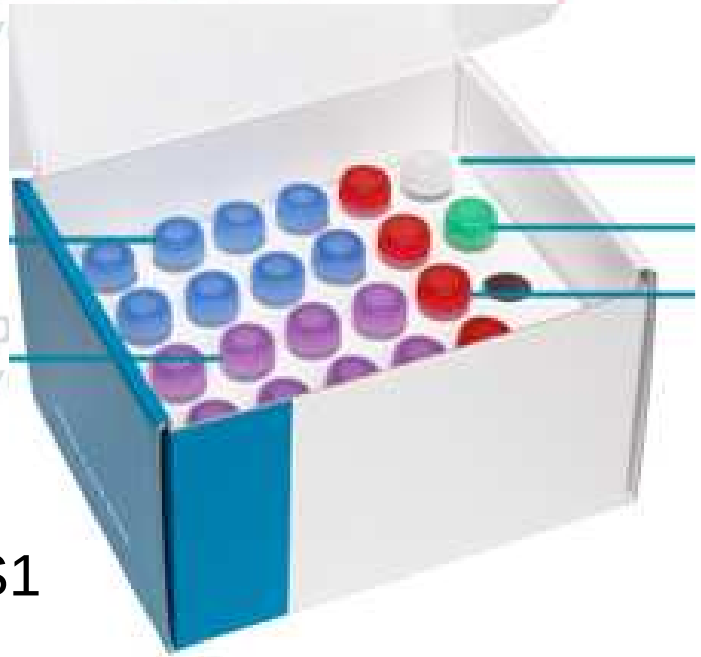
CARGAS VIRALES

- Los estudios se realizan con plasma del paciente
- También puede realizarse en otras muestras:
  - o LCR
  - o Médula ósea
  - o Líquidos estériles
  - o Biopsias
- Técnicas muy sensibles y especificas
- Si el patógeno puede persistir en el organismo después de la infección aguda (herpesvirus, parvovirus,…) valorar con la clínica del paciente

GENERALITAT VALENCIANA
Hospital General Universitari d'Alacant

DETECCIÓN POR PCR A TIEMPO REAL

- Detección y cuantificación
- Muestra: Plasma (tubo de sangre con EDTA)
- Límite de detección: 125 UI/mL
- Rango lineal: 1250-1.250.000.000 UI/mL



- Reactivos
  - Componentes para la amplificación y detección de Parvovirus B19
  - Control Interno (IC)
  - Cuatro estándares de cuantificación (QS1 - QS4)
    - Concentraciones estándar de la secuencia diana del PVB19
    - Calibrados según los estándares de la OMS
- Marcado CE

GENERALITAT VALENCIANA Hospital General Universitari d'Alacant

DETECCIÓN POR PCR A TIEMPO REAL

- Interpretación cualitativa
- Interpretación cuantitativa
  - De la curva estándar generada se extrapola la concentración

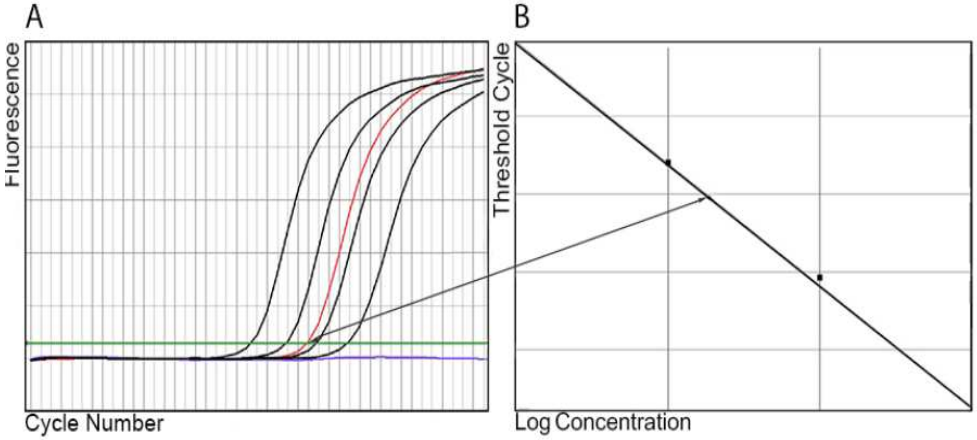


Figure 1: Quantification Standards (black), a positive (red) and a negative sample (blue) displayed in the Amplification Plot [**A**] and Standard Curve analysis [**B**]

Detection Channel		Result Interpretation	
FAM™	JOE™		
+	+*	Parvovirus B19 specific DNA detected.	Se detecta XX UI/mL
-	+	No parvovirus B19 specific DNA detected. Sample does not contain detectable amounts of parvovirus B19 specific DNA.	No se detecta
-	-	PCR inhibition or reagent failure. Repeat testing from original sample or collect and test a new sample.	No amplifica

GENERALITAT VALENCIANA
Universitari d'Alacant

TÉCNICAS MOLECULARES

VIRUS	BACTERIAS	PARÁSITOS
• HIV • Hepatitis B • Hepatitis C • Herpes 1 y 2 • Varicella • Citomegalovirus • Epstein Barr • Parvovirus B19 • Gripe A y B • VRS • Zika, Dengue y Chikungunya • Virus SNC	• Chlamydia trachomatis • Neisseria gonorrhoeae • Bordetella pertussis • Bacterias SNC	• Leishmania • Trypanosoma cruzi

CONCLUSIONES

- Diagnóstico de infección aguda por parvovirus en paciente inmunocompetente: estudio serológico porque la viremia desaparece muy pronto

- Diagnóstico de infección persistente en paciente inmunodeprimido seropositivo:
  - o No sirve la serología
  - o La carga viral en plasma puede ser indetectable o muy baja
    - Importante enviar muestra de médula ósea

- Pacientes expuestos: Presencia de IgG en ausencia de IgM

CONCLUSIONES

AGRADECIMIENTOS

- Unidad de Enfermedades Infecciosas
- Servicio de Nefrología: Unidad de Trasplantes
- Servicio de Microbiología