

Redescubriendo el anticuerpo a hepatitis C. Nuevas estrategias de escrutinio y diagnóstico

Ana M. Contreras-Navarro,^a Claudia M. Tornero-Romo,^b Axel Orozco-Hernández,^a María Isabel Hernández-Lugo,^c Patricia Romero-Flores^c y Alfredo Celis de la Rosa^{d,e}

^aCoordinación de Investigación en Salud en Jalisco, Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco, México.

^bDepartamento de Medicina Interna, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco, México.

^cBanco Central de Sangre, UC UMAE Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social. Guadalajara, Jalisco, México.

^dUnidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional de Occidente. Instituto Mexicano del Seguro Social, Guadalajara, Jalisco, México.

^eDepartamento de Salud Pública, Centro Universitario de Ciencias de la Salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México.

RESUMEN

El anticuerpo a hepatitis C (anti-HCV) es la prueba de escrutinio para la infección por el virus de la hepatitis C (HCV). Recientemente se han reconocido las siguientes características del anticuerpo: (a) es una prueba semicuantitativa que se expresa con el índice S/CO, (b) tiene elevada concordancia entre duplicados, (c) el índice S/CO varía con la generación y el método del inmunoensayo, (d) los resultados falsos y verdaderos positivos del anti-HCV y su relación con el índice S/CO, así como (e) el nivel alto del índice S/CO es un marcador serológico de viremia. Una prueba única es suficiente para concluir reactividad del anti-HCV, por lo que se propone una nueva estrategia de escrutinio con los ensayos de Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV. Las mejores estrategias de diagnóstico de hepatitis C utilizan el nivel del índice S/CO para elegir la prueba complementaria (RIBA o HCV RNA) que confirme el diagnóstico de hepatitis C. Los niveles bajos del índice S/CO predicen resultados falsos positivos del anti-HCV y los niveles altos se relacionan con los resultados verdaderos positivos y además son marcadores serológicos de viremia: estos niveles son específicos para cada inmunoensayo, debido a las diferencias entre los métodos. El reporte del anti-HCV debe modificarse para incluir la reactividad (evitar la interpretación del resultado como positivo o negativo), la generación y el método del inmunoensayo, el nivel del índice S/CO y la guía de interpretación con la prueba complementaria recomendada. La aplicación de las nuevas estrategias y recomendaciones reducirá los costos e incrementará la eficiencia del escrutinio y diagnóstico de la hepatitis C.

SUMMARY

The hepatitis C antibody (anti-HCV) is the screening test used for the hepatitis C virus (HCV) infection. Recently, the following antibody characteristics were described: (a) it is a semiquantitative test expressed by the S/CO ratios, (b) has high repeatability between duplicates, (c) the S/CO ratios of the anti-HCV vary due to the generation and immunoenzymatic methods, (d) true and false results of the antibody and its association with the S/CO ratio, and (e) the high level of the S/CO ratio is a serologic marker for viremia. A reactive unique test is enough to conclude reactivity in the screening of HCV infection. We propose a new screening strategy using the Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV and Abbott ChLIA PRISM® HCV immunoassays. These new diagnostic strategies for hepatitis C use the level of the S/CO ratio to choose the supplemental test (RIBA or HCV RNA) to confirm the hepatitis C diagnosis with an optimal cost-effectiveness strategy. The low positive levels of S/CO ratio predict false positive results in the antibody and the high level is associated with true positive results. It is also a serological marker for viremia. These levels are specific for each immunoassay due to differences between methods. Notification of the screening test results should be modified to include reactivity (and avoid the interpretation as positive or negative), generation and immunoassay methods, the level of S/CO ratio and the interpretation guidelines for each immunoassay with the reflex supplemental testing. The application of these guidelines will reduce costs increasing the efficiency of the screening and diagnostic strategies for hepatitis C.

Palabras clave:

Hepatitis C, anti-HCV, índice S/CO, nuevas estrategias de escrutinio y diagnóstico

Key words:

Hepatitis C, anti-HCV, S/CO ratio, novel screening and diagnostic strategies

* Correspondencia solicitud de sobretiros: Ana M. Contreras: Coordinación de Investigación en Salud en Jalisco, Instituto Mexicano del Seguro Social, San Juan de Ulúa 1633, Jardines del Country, CP 44210, Guadalajara, Jalisco, México. Teléfono: (52) (33) 38542949; fax: (52) (33) 36170060 ext. 31150; correo electrónico: acontreras53@hotmail.com

Introducción

Aproximadamente 1 a 3 de cada 100 personas adultas en México tienen infección por el virus de la hepatitis C (HCV) y probablemente pocas conocen su enfermedad. En EUA se estima que únicamente 50% tiene diagnóstico de la infección.¹ El escrutinio y el diagnóstico de la hepatitis C se realizan con dos categorías de pruebas de laboratorio: los ensayos serológicos que detectan anticuerpos al HCV (pruebas indirectas) y las pruebas moleculares o de ácidos nucleicos que identifican las partículas virales (pruebas directas).²⁻⁴

El anticuerpo a hepatitis C (anti-HCV) se utiliza como prueba de escrutinio universal en donadores de sangre y es la prueba inicial para el diagnóstico de la infección por el HCV en personas con factores de riesgo o manifestaciones clínicas de enfermedad hepática.^{5,6} El anti-HCV se determina por ensayos inmunoenzimáticos, parcial o completamente automatizados, de bajo costo, que se encuentran ampliamente disponibles.⁷⁻⁹ El resultado positivo del anti-HCV debe ser validado con las pruebas complementarias para confirmar el diagnóstico de hepatitis C. Las pruebas complementarias son el ensayo de inmunoblot recombinante (RIBA) y la prueba de ácidos nucleicos del virus (HCV RNA).^{10,11}

La prueba de RIBA es una prueba serológica indirecta, con elevada especificidad.^{2,12,13} Las pruebas del HCV RNA detectan el virus (prueba cualitativa), miden la concentración (prueba cuantitativa o carga viral) y determinan el tipo de virus (genotipo). El HCV RNA se detecta mediante la reacción en cadena de la polimerasa por transcripción inversa (RT-PCR) o amplificación mediada por transcripción (TMA). Las pruebas moleculares en tiempo real son las más sensibles y específicas (ejemplo: COBAS TaqMan48 HCV, Roche Diagnostics).¹⁴

La confirmación de la hepatitis C en las personas con anticuerpo positivo se puede establecer con la prueba com-

plementaria inicial (ejemplo: anti-HCV positivo \Rightarrow HCV RNA positivo), o bien, requerir una segunda prueba (ejemplo: anti-HCV positivo \Rightarrow HCV RNA negativo \Rightarrow RIBA positivo). En los laboratorios clínicos y de los bancos de sangre, la disponibilidad de las pruebas complementarias es limitada debido a los costos altos, la necesidad de personal capacitado y equipo especializado; además la secuencia con las que se realizan estas pruebas depende de la preferencia o experiencia del personal de salud que las solicita.¹¹

Los resultados de estudios de investigación realizados en la última década demuestran que el conocimiento de las características o cualidades del anti-HCV es muy importante para definir las mejores estrategias de escrutinio y diagnóstico de hepatitis C como se describe a continuación:

Características del anti-HCV

El anti-HCV es una prueba semi-cuantitativa que se expresa con el índice S/CO

Tradicionalmente, el resultado del anti-HCV se interpreta cualitativamente y se reporta como positivo o negativo, aún cuando los inmunoensayos detectan el anti-HCV mediante una reacción antígeno-anticuerpo y su intensidad es directamente proporcional a la concentración del anticuerpo, que se mide en una escala de valores continuos (semicuantitativamente) con el índice S/CO (del inglés signal to cutoff). El índice se obtiene al dividir la señal que emite la muestra entre un control y es calculado automáticamente por el equipo; el índice se observa en la pantalla, simultáneamente con el reporte de reactividad. Las muestras con índice S/CO < 1 se interpretan y se reportan como negativas y las muestras con índice S/CO ≥ 1 se interpretan como reactivas y se reportan como positivas.¹⁵⁻¹⁷

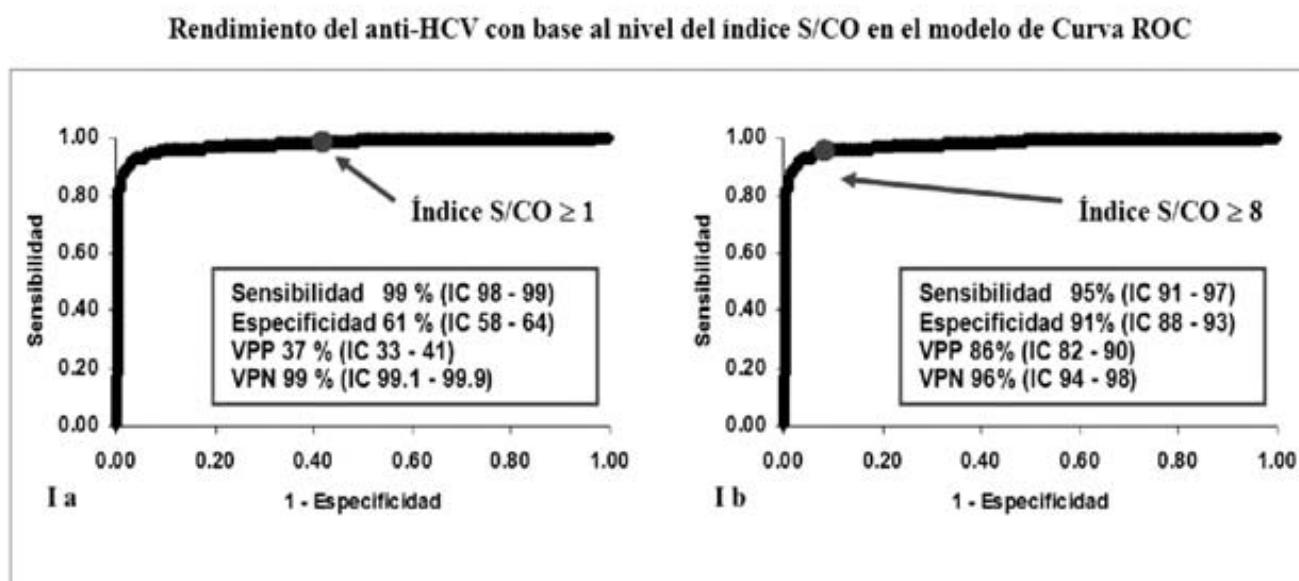


Figura 1. El rendimiento (sensibilidad y especificidad) de la prueba del anticuerpo se compara entre el índice S/CO ≥ 1 (Figura Ia), con el índice ≥ 8 (Figura Ib). ROC = Característica de Operación Receptora. VPP = Valor Predictivo Positivo. VPN = Valor Predictivo Negativo. IC = Intervalo de Confianza del 95%.

La sensibilidad y especificidad del inmunoensayo dependen del nivel del índice S/CO (punto de corte) que se elige para definir el resultado positivo del anticuerpo y se demuestra gráficamente en un modelo de curva ROC (característica de operación receptora) (Figura 1). Se describe el ejemplo con una población de 649 donadores de sangre con anti-HCV positivo con el ensayo Ortho ChLIA VITROS® HCV; en esta población se utilizó como estándar de oro la prueba de RIBA (HCV 3.0 SIA, Chiron Corp) (Contreras AM y cols. Memorias del Congreso Mexicano de Hepatología 2007, Acapulco, Guerrero, México). El rendimiento de la prueba (sensibilidad y especificidad) se compara con dos niveles del índice S/CO (Figuras 1a y 1b): cuando se elige el índice S/CO ≥ 1 para clasificar la prueba del anticuerpo como positiva, la sensibilidad es de 99% (IC 95%, 98 - 99) y la especificidad es baja (61%; IC 95% 58 - 64) (Figura 1a). En contraste, al mover el punto de corte a la izquierda y elegir el índice S/CO ≥ 8 para definir la positividad, se observa aumento en la especificidad (91%; IC 95%, 88 - 93), obteniendo un mejor rendimiento de la prueba (Figura 1b). Los valores predictivos positivos y negativos de la prueba se relacionan con la prevalencia de la infección por el HCV en la población evaluada (a mayor prevalencia, mayor proporción de resultados verdaderos positivos).

El nivel del índice S/CO puede ser modificado para definir la positividad del anticuerpo dependiendo del escenario clínico, es decir, según el uso que se pretenda (escrutinio o diagnóstico) y el interés de quien interpreta la prueba: por ejemplo, en los bancos de sangre el índice S/CO ≥ 1 ofrece la sensibilidad más elevada (99 %) para detectar sangre contaminada con el HCV.^{7,18,19} En cambio, en el ámbito clínico es importante identificar los resultados verdaderos y falsos positivos del anticuerpo: como se observa en la figura 1a, con el índice S/CO ≥ 1 una proporción elevada de muestras clasificadas como positivas, en realidad corresponden a resultados falsos positivos del anticuerpo (especificidad baja).^{11,20} En contraste, si se elige el índice S/CO ≥ 8 , como el nivel a partir del cual se define la positividad del anticuerpo, se reducen de manera importante los resultados falsos positivos (especificidad 91%) (Figura 1b). Los niveles del índice que definen el rendimiento de la prueba (sensibilidad y especificidad) varían con relación al método del inmunoensayo.

El nivel del índice S/CO del anti-HCV debe ser elegido de acuerdo al ámbito de aplicación, es decir, como prueba de escrutinio en los bancos de sangre o como prueba diagnóstica en las áreas clínicas.

El anti-HCV tiene elevada concordancia entre duplicados (correlación intra-ensayo)

Las muestras del anti-HCV con el resultado inicialmente reactivo se repiten por duplicado y los resultados doblemente reactivos se interpretan como positivos. Los laboratorios clínicos y de los bancos de sangre alrededor del mundo realizan este procedimiento de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EUA recomendó realizar una prueba única en las muestras inicialmente reactivas cuando se utiliza el

ensayo Ortho ChLIA VITROS® HCV: esta recomendación se estableció con base en evaluaciones realizadas por el fabricante.¹¹ Recientemente se realizó el Estudio Multicéntrico donHCVir en 23 Bancos de Sangre del Instituto Mexicano del Seguro Social, para determinar si realmente es necesario realizar por duplicado la prueba del anti-HCV para definir el resultado positivo del anticuerpo.²¹ Se evaluó la correlación intra-ensayo entre el primero y segundo resultado reactivo del anti-HCV con el inmunoensayo de micropartículas (MEIA) y dos ensayos de quimioluminiscencia (ChLIA) en 565 donaciones de sangre: 229 muestras con el ensayo de Abbott MEIA AxSYM® HCV; 222 con Ortho ChLIA VITROS® HCV y 114 con Abbott ChLIA PRISM® HCV. La concordancia entre duplicados (primera y segunda prueba) fue significativamente elevada con los coeficientes de correlación de 0.996, 0.995 y 0.993, respectivamente. La reproducibilidad de los resultados en los 23 bancos de sangre participantes, ubicados a lo largo del territorio mexicano, se atribuyó a la confiabilidad de los inmunoensayos y de los equipos actualmente disponibles.

Se concluyó, que los resultados inicialmente reactivos con los ensayos Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV deben ser interpretados como positivos (reactivos) y no es necesario que la prueba del anti-HCV se realice por duplicado.

El índice S/CO del anti-HCV varía con la generación y el método del inmunoensayo

Los inmunoensayos se han diseñado para detectar anticuerpos dirigidos a las proteínas estructurales y no estructurales del genoma del HCV (Figura 2). La clasificación de los inmunoensayos es compleja; de manera simplificada, se describen las características relacionadas con la generación (ejemplo: versión 1.0, versión 2.0 y versión 3.0) y el método del ensayo (ejemplo: colorimetría, inmunofluorescencia o quimioluminiscencia). Los inmunoensayos de segunda y tercera generación del anti-HCV, aprobados por la Food and Drug Administration de EUA, disponibles actualmente son los siguientes: Abbott HCV EIA 2.0, Ortho HCV version 3.0 ELISA TestSystem, Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV, Bayer ChLIA ADVIA® Centaur HCV, Abbott ChLIA PRISM® HCV, y Abbott CMIA ARCHITECT® HCV.

Las diferencias entre las generaciones de los inmunoensayos se relacionan con los anticuerpos dirigidos a las proteínas específicas del genoma viral. La primera generación (versión 1.0), estuvo disponible a partir de 1990, detecta el antígeno recombinante c100-3 localizado en la región no estructural NS4.²² Los ensayos de segunda generación (versión 2.0), implementados en 1992, incluyen además antígenos de las regiones Core y NS3, mientras que la tercera generación (versión 3.0), aprobada en 1996, también incluye la región NS5. Esta última generación es más sensible y específica que las versiones previas; detecta anticuerpos dirigidos a epítopos mejor caracterizados en un mayor número de sitios del genoma viral (Core, NS3, NS4 y NS5) (Figura 2).^{12,19,23,24} En México, los inmunoensayos de tercera generación más frecuentemente utilizados son (Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV).²¹

Representación del genoma del HCV y las regiones que detectan los inmunoensayos

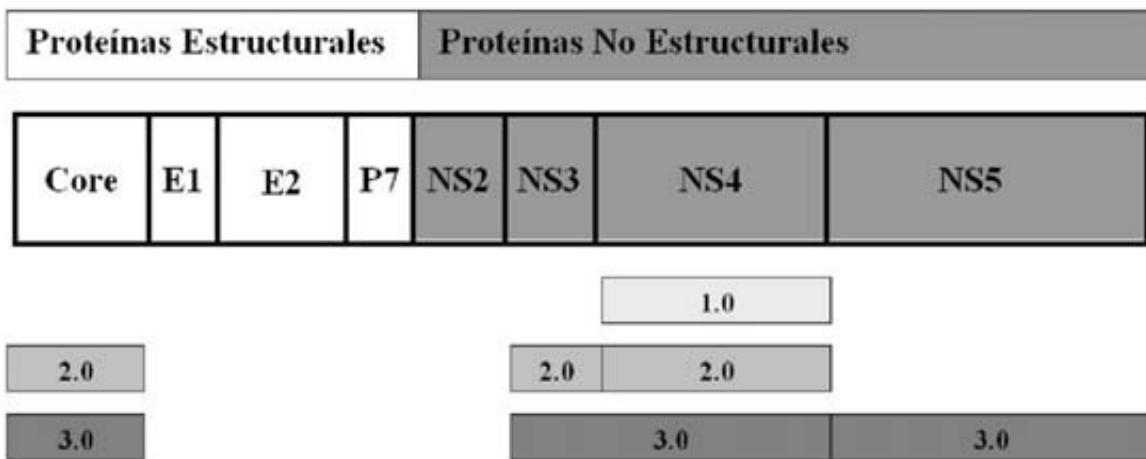


Figura 2. La versión 1.0 detecta el antígeno recombinante c100-3 de la región NS4. La versión 2.0 detecta además las regiones NS3 y Core. La versión 3.0 es más sensible y específica ya que también detecta los anticuerpos dirigidos a la región NS5 y reconfigura la región core y antígenos de la región NS3.

Las diferencias entre los métodos de los inmunoensayos se relacionan con el tipo de agentes (biológicos o químicos) que revelan la unión antígeno-anticuerpo con una señal que es medida por el índice S/CO: los niveles del índice se relacionan con las diferencias en la intensidad de la señal, según el método del inmunoensayo utilizado (ejemplo: color, fluorescencia o luz).

En un estudio reciente en 565 donaciones con anti-HCV positivo, se observaron diferencias en el promedio del índice S/CO entre los ensayos Abbott MEIA AxSYM® HCV, índice S/CO de 34.5 (IC 95 %, 27.4 - 41.5); Ortho ChLIA VITROSS® HCV, índice S/CO de 11.9 (IC 95%, 10.3-13.5); y Abbott ChLIA PRISM® HCV, índice S/CO de 3.2 (IC 95 %, 2.8 - 3.6).²¹ Por otro lado, se evaluaron simultáneamente 114 donaciones con anti-HCV positivo, para comparar los niveles del índice S/CO con dos inmunoensayos de quimioluminiscencia. El índice promedio fue de 11.1 (IC 95 % 9.0 - 13.2) con el ensayo de Ortho ChLIA VITROS® HCV (quimioluminiscencia indirecta amplificada) y 3.3 (IC 95 % 2.8 - 3.7) con el ensayo Abbott ChLIA PRISM® HCV (quimioluminiscencia indirecta). La intensidad de la señal con el ensayo de quimioluminiscencia indirecta amplificada es mayor, debido a que se usa un agente de transferencia de electrones que incrementa la señal (luz).^{8,16}

En conclusión, es importante conocer la generación y el método del inmunoensayo para interpretar el índice S/CO del anticuerpo.

Los resultados falsos y verdaderos positivos del anti-HCV y su relación con el índice S/CO

El resultado positivo del anticuerpo debe ser validado con las pruebas complementarias de RIBA y/o HCV RNA para confirmar (anticuerpo verdadero positivo) o descartar (anticuerpo falso positivo) el diagnóstico de hepatitis C (Cuadro I). La

positividad del HCV RNA confirma el resultado verdadero positivo del anticuerpo y demuestra replicación viral.^{3,25,26} Por otro lado, un resultado negativo del HCV RNA no excluye infección por el HCV, y se requiere la prueba de RIBA para establecer el estatus serológico en ausencia de viremia.^{11,27,28} Los resultados de RIBA se reportan como positivos, negativos o indeterminados. La prueba positiva confirma el anticuerpo verdadero positivo; la prueba negativa se interpreta como ausencia de infección e identifica los resultados falsos positivos del anti-HCV. El RIBA indeterminado puede representar falsa reactividad del anticuerpo o infección crónica resuelta. En poblaciones de bajo riesgo como los donadores de sangre, el resultado indeterminado de la prueba de RIBA en muestras con anti-HCV positivo-HCV RNA negativo, se interpreta como resultado falso positivo del anticuerpo.^{11,29} Por otro lado, el anti-HCV negativo con HCV RNA positivo puede ocurrir durante el período de ventana serológica o por inmunosupresión (anticuerpo falso negativo).^{2,11,30}

Una vez que estuvieron disponibles las pruebas complementarias de RIBA y HCV RNA para confirmar el diagnóstico de hepatitis C en las muestras con anti-HCV positivo, fue evidente que los niveles bajos del índice S/CO se relacionan con resultados falsos positivos, mientras que los altos con anticuerpos verdaderos positivos. Debido a las diferencias entre los inmunoensayos, el punto de corte óptimo que define los niveles altos y bajos positivos es variable; el alto positivo se define a partir del nivel óptimo que predice el resultado positivo de las pruebas complementarias en 95% de las muestras en diferentes poblaciones para cada inmunoensayo y los niveles bajos positivos se consideran por debajo de este nivel (Cuadro II).^{11,20,27,31-33} Los niveles del índice S/CO que predicen los resultados falsos y verdaderos positivos han sido definidos para los ensayos de Abbott HCV EIA 2.0, Ortho HCV 3.0 ELISA, Abbott MEIA AxSYM® HCV y Ortho ChLIA VITROS® HCV.

Cuadro I. Interpretación del anti-HCV positivo y negativo en relación con los resultados de las pruebas complementarias, RIBA y HCV RNA, para confirmar (resultados verdaderos) o descartar (resultados falsos) el diagnóstico de hepatitis C.

<u>HEPATITIS C</u>		<u>NO-HEPATITIS C</u>
Anti-HCV VERDADERO POSITIVO		Anti-HCV FALSO POSITIVO
Anti-HCV Positivo	Anti-HCV positivo/RIBA positivo Anti-HCV positivo/HCV RNA positivo Anti-HCV positivo/RIBA positivo/HCV RNA positivo Anti-HCV positivo/RIBA positivo/HCV RNA negativo Anti-HCV positivo/RIBA indeterminado/HCV RNA positivo	Anti-HCV positivo/RIBA negativo Anti-HCV positivo/RIBA indeterminado/HCV RNA negativo
Anti-HCV Negativo	Anti-HCV negativo/HCV RNA positivo	Anti-HCV negativo/HCV RNA negativo
Anti-HCV FALSO NEGATIVO		Anti-HCV VERDADERO NEGATIVO

Anti-HCV = Anticuerpo a Hepatitis C. RIBA = Ensayo de inmunoblot recombinante. HCV RNA = Ácido ribonucleico del virus de Hepatitis C.

Cuadro II. Niveles óptimos del índice S/CO que predicen los resultados falsos y verdaderos positivos del anti-HCV y viremia para cada inmunoensayo

Inmunoensayo	Índice S/CO		
	Bajo Positivo	Alto Positivo	Alto Positivo
	Resultados falsos positivos	Resultados verdaderos positivos	Resultados verdaderos positivos con viremia
Abbott HCV EIA 2.0 ^{11,31}	<3.8	≥3.8	ND
Ortho HCV 3.0 ELISA ^{11,27,31}	<3.8	≥3.8	ND
Abbott MEIA AxSYM® HCV ^{31,33}	<10	≥10	>50
Ortho ChLIA VITROS® HCV ^{20,31,32}	<8	≥8	≥20
Abbott ChLIA PRISM® HCV *	ND	ND	≥3.5

Poblaciones estudiadas en los reportes de la literatura que se incluyen.

Ref = Referencia. Ref. 11: Poblaciones de baja prevalencia (2%): estudiantes, población general, trabajadores de la salud, pacientes en hemodiálisis (9.5 %) y pacientes de alto riesgo (24.9%). Ref 20 Donadores de sangre (0.76%). Ref. 27: Veteranos de guerra (6.6%). Ref. 31: No se especifican poblaciones. Ref. 32 Veteranos de guerra (10%). Ref 33 Pacientes de hospital de tercer nivel evaluados por sospecha clínica. *Fuente: Rivera R y cols, Congreso Mexicano de Medicina Transfusional 2006 (memorias congreso nacional de medicina transfusional, 2006). ND= no hay datos.

En conclusión, niveles específicos del índice S/CO del anti-HCV se relacionan directamente con los resultados de las pruebas confirmatorias de hepatitis C, RIBA y/o HCV RNA, y son variables dependiendo del inmunoensayo.

El nivel alto del índice S/CO es un marcador serológico de viremia

Las técnicas moleculares para detectar y cuantificar partículas virales han mejorado notablemente en la última década con el desarrollo de métodos más sensibles: el HCV RNA es detec-

tado 1-3 semanas postexposición y permanece por décadas en pacientes que no reciben tratamiento antiviral. Existe relación directa entre los resultados positivos del HCV RNA y el nivel alto del índice S/CO del anticuerpo: a mayor índice, mayor proporción de muestras con viremia.^{11,13,20,27,32-34}

El nivel del índice S/CO en las muestras con viremia fue más alto (promedio de 28.35, DS 5.42) cuando se comparó con el índice de las muestras con resultado verdadero positivo sin viremia (promedio de 17.3, DS 11.49) ($p < 0.001$) en 649 donadores con anti-HCV positivo con el ensayo Ortho ChLIA VITROS® HCV y el estándar de oro con la prueba de HCV RNA cualitativa (Cobas Amplicor HCV, versión 2.0,

Roche Diagnostics Systems, Branchburg, NJ) (Contreras AM y cols. Memorias del Congreso Mexicano de Hepatología 2007. Acapulco, Guerrero, México). El nivel del índice S/CO refleja la concentración del anticuerpo y es probable que la replicación continua del virus estimule la mayor producción de anticuerpos. El método y la generación del inmunoensayo se relacionan con los niveles del índice que predicen viremia (Cuadro II).

El nivel alto del índice S/CO del anticuerpo se relaciona con elevada probabilidad de infección por el HCV, y en personas asintomáticas este hallazgo es una "oportunidad de oro" para identificar enfermedad hepática crónica, ofrecer tratamiento antiviral oportuno y así evitar complicaciones como la cirrosis hepática y el hepatocarcinoma.

Únicamente en los ensayos Abbott MEIA AxSYM® HCV y Ortho ChLIA VITROS® HCV se ha reportado el nivel del índice S/CO que predice de viremia.^{11,20,32,33} Recientemente se realizó un estudio para evaluar el ensayo Abbott ChLIA PRISM® HCV en 150 donadores de sangre con anti-HCV positivo. El índice S/CO ≥ 3.5 fue el nivel óptimo para predecir viremia (sensibilidad 96%; IC 95%, 88 - 99 y especificidad 97%; IC 95%, 91 - 99) (Rivera R y cols., Memorias del Congreso Mexicano de Medicina Transfusional 2006) (Cuadro II).

Los niveles altos del anti-HCV no sustituyen la prueba del HCV RNA en ningún caso. Aproximadamente 9 de cada 10 muestras con niveles altos del índice S/CO, son positivas para el HCV RNA con los ensayos de Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV.²⁰

En conclusión, los niveles altos del índice S/CO, específicos de cada inmunoensayo, son marcadores serológicos de viremia.

Nuevas estrategias de escrutinio de la hepatitis C

Es suficiente una prueba reactiva única del anti-HCV

El escrutinio de la hepatitis C en poblaciones asintomáticas (ejemplo: donadores de sangre y población general) se realiza con la prueba del anti-HCV; su determinación es obligatoria en las donaciones para garantizar la sangre segura y las donaciones de sangre con resultados positivos son eliminadas.⁶ En los instructivos que acompañan los kits de los inmunoensayos se establece que las muestras con resultados inicialmente reactivos deben realizarse por duplicado y los resultados doblemente reactivos se interpretan como positivos.¹⁵⁻¹⁷

Recientemente se demostró elevada concordancia entre duplicados del anticuerpo; con base a estos resultados se propone una nueva estrategia de escrutinio, que consiste en establecer la positividad del anti-HCV con el resultado inicialmente reactivo, es decir, con índice S/CO ≥ 1 , con los ensayos Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV.

La Norma Oficial Mexicana 003-SSA2-1993 establece que el anti-HCV debe realizarse "de acuerdo a las instrucciones establecidas por los fabricantes", por lo que es necesario que éstas se actualicen para aplicar la nueva estrategia en

los laboratorios clínicos y de los bancos de sangre. Los otros inmunoensayos disponibles deben ser evaluados antes de extender la recomendación.

En conclusión, la nueva estrategia de escrutinio elimina la necesidad de realizar la prueba del anti-HCV por duplicado y puede ser aplicada a cualquier población cuando se utilizan los ensayos de Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV.

Prueba del HCV RNA con la técnica de minimuestras mezcladas (MMM)

El escrutinio de las donaciones de sangre con el anti-HCV disminuyó en forma importante la transmisión del HCV en la última década. Actualmente el riesgo de adquirir la infección varía entre 1 en 50,000 a 1 en 700,000 donaciones y se relaciona con el periodo de ventana serológica, la presencia de variantes virales, la seroconversión atípica y los errores de los inmunoensayos; con el objetivo de eliminar el riesgo de adquirir la infección a partir de donaciones de sangre contaminadas con los anticuerpos falsos negativos, se implementó en EUA y en la Comunidad Europea, el escrutinio en las donaciones de sangre con pruebas moleculares por la técnica de minimuestras mezcladas (MMM) para identificar infección por el HCV, hepatitis B y virus de inmunodeficiencia.^{30,35} La técnica consiste en mezclar pequeños volúmenes de 6, 12, 24 o 48 muestras en una misma reacción para la detección de las partículas virales; al detectar una mini-mezcla positiva, las donaciones se evalúan de manera individual para identificar la(s) muestra(s) positiva(s).^{28,36-39} En México la técnica de MMM no se realiza de manera rutinaria en los bancos de sangre y probablemente se utilizará en el futuro como complemento de los inmunoensayos para el escrutinio de la infección por el HCV.^{28,40}

Nuevas estrategias de diagnóstico de hepatitis C

No existe relación entre los síntomas y la severidad de la enfermedad hepática crónica, por lo que es necesario aplicar estrategias de diagnóstico para confirmar la infección por el HCV en personas con el anticuerpo positivo. Aproximadamente el 85% de las personas evolucionan a la cronicidad y típicamente permanecen asintomáticas durante décadas.⁴¹⁻⁴³ En México el promedio de edad de los individuos infectados con el HCV es de 30 años a 50 años, con expectativa de vida de aproximadamente 70 años, por lo que tienen mayor riesgo de morbilidad y mortalidad por complicaciones como la cirrosis hepática y el hepatocarcinoma.⁴⁴

Los métodos diagnósticos han evolucionado gradualmente del uso de pruebas bioquímicas a las pruebas serológicas y moleculares para el diagnóstico de hepatitis C. La Ley General de Salud establece que "se debe confirmar la infección por el HCV por los medios clínicos disponibles, con la finalidad de investigar, prevenir y controlar la enfermedad" (Diario oficial de la Federación de México, 18 de Febrero del 2007). La estrategia de diagnóstico ideal debe identificar los individuos infectados (serostatus) y aquellos crónicamente

Cuadro III a. Estrategia de diagnóstico con base al índice S/CO del anti-HCV con el ensayo de Abbott MEIA AxSYM® HCV

Índice S/CO	Reporte	Interpretación	Prueba complementaria recomendada
1.0-50	Reactiva	Requiere prueba complementaria	RIBA
>50	Reactiva	Requiere prueba complementaria	HCV RNA

RIBA = Ensayo de inmunoblot recombinante. HCV RNA = Ácido ribonucleico del virus de la Hepatitis C.

Cuadro III b. Estrategia de diagnóstico con base al índice S/CO del anti-HCV con el ensayo de Ortho ChLIA VITROS® HCV

Índice S/CO	Reporte	Interpretación	Prueba complementaria recomendada
1.0-19.99	Reactiva	Requiere prueba complementaria	RIBA
≥ 20	Reactiva	Requiere prueba complementaria	HCV RNA

RIBA = Ensayo de inmunoblot recombinante. HCV RNA = Ácido ribonucleico del virus de la Hepatitis C.

Cuadro III c. Estrategia de diagnóstico con base al índice S/CO del anti-HCV con el ensayo de Abbott ChLIA PRISM® HCV

Índice S/CO	Reporte	Interpretación	Prueba complementaria recomendada
1.0-3.49	Reactiva	Requiere prueba complementaria	RIBA
≥ 3.5	Reactiva	Requiere prueba complementaria	HCV RNA

RIBA = Ensayo de inmunoblot recombinante. HCV RNA = Ácido ribonucleico del virus de la Hepatitis C.

infectados (estatus viral).^{45,46} Sin embargo, habitualmente los laboratorios en nuestro país informan el anti-HCV positivo sin validar el resultado con las pruebas complementarias, probablemente porque su disponibilidad es limitada porque se realizan en laboratorios de referencia, y los costos son elevados. Por otro lado, existe desconocimiento entre los profesionales de la salud con relación en la interpretación de la pruebas serológicas y moleculares para el diagnóstico de hepatitis C.¹¹

En el ámbito clínico, cuando se está ante un resultado positivo del anti-HCV, la estrategia de diagnóstico con mayor costo-efectividad se basa en el nivel del índice S/CO del anticuerpo para elegir la prueba complementaria inicial que es concluyente del estatus serológico y/o viral en 90% de los casos [ejemplo: (anti HCV bajo positivo ⇒ RIBA negativo) o (Anti-HCV alto positivo ⇒ HCV RNA positivo)].^{20,47} La elección de la prueba complementaria más adecuada para validar el resultado positivo del anticuerpo de acuerdo a los niveles del índice S/CO y con los inmunoensayos más frecuentemente utilizados en México se describe a continuación:

1. Abbott MEIA AxSYM® HCV (Cuadro IIIa): Se recomienda la prueba de RIBA en las muestras con el índice S/CO entre 1.0 y 50, porque en este margen de niveles la proporción de resultados positivos del HCV RNA es menor a 5%; En muestras con niveles bajos positivos del índice S/CO y el resultado negativo de la prueba de RIBA, se concluye anticuerpo falso positivo; estas muestras no requieren evaluación adicional. En las muestras con índice S/CO > 50 se debe realizar la prueba de HCV RNA, si ésta es positiva, se confirma

el resultado verdadero positivo con viremia y la necesidad evaluación diagnóstica adicional.

2. Ortho ChLIA VITROS® HCV (Cuadro IIIb): Se recomienda en las muestras con el índice S/CO de 1.0 a 19.99 realizar la prueba de RIBA debido a que en este margen la proporción de resultados positivos del HCV RNA es menor a 5%. En muestras niveles bajos positivos del índice S/CO y resultado negativo de la prueba de RIBA, se concluye resultado falso positivo del anticuerpo; estas muestras no requieren evaluación adicional. En las muestras con índice S/CO ≥ 20 realizar la prueba de HCV RNA, si ésta es positiva, se confirma el resultado verdadero positivo con viremia y requiere evaluación diagnóstica adicional.

3. Abbott ChLIA PRISM® HCV (Cuadro IIIc): En las muestras con el índice S/CO de 1.0 a 3.49 con el ensayo la prueba recomendada es RIBA, ya que aquí la proporción de resultados positivos del HCV RNA es menor a 5%. En muestras con niveles bajos positivos del índice S/CO y resultado negativos de la prueba de RIBA, se concluye resultado falso positivo del anticuerpo; estas muestras no requieren evaluación adicional. En las muestras con índice S/CO ≥ 3.5 realizar la prueba de HCV RNA, si ésta es positiva, se confirma el resultado verdadero positivo con viremia y requiere evaluación diagnóstica adicional.

Aún cuando la elección de la prueba complementaria se realice de acuerdo con el nivel del índice S/CO y de acuerdo a las recomendaciones señaladas, en aproximadamente 10% de las muestras con anti-HCV positivo, la prueba inicial no permite definir el estatus serológico y/o viral, y se requiere

una segunda prueba complementaria (ejemplo: anti-HCV alto positivo \Rightarrow HCV RNA negativo \Rightarrow RIBA positivo) (Cuadro I). A continuación se describen algunos escenarios específicos:

- En muestras con niveles bajos positivos del índice S/CO y el resultado positivo de la prueba de RIBA se debe realizar la prueba de HCV RNA, para definir el estatus viral y evaluación diagnóstica adicional con la evidencia de replicación viral.
- En las muestras con RIBA indeterminado y niveles altos del índice S/CO, se debe realizar la prueba de HCV RNA para definir el estatus viral y la necesidad de evaluación diagnóstica adicional con la evidencia de replicación viral.
- Con los niveles altos del índice S/CO y negatividad del HCV RNA se requiere realizar RIBA para definir el estatus serológico. El HCV RNA negativo puede estar relacionado con replicación viral por debajo del límite inferior de detección, relacionado con la sensibilidad de la técnica o un resultado falso negativo de la prueba molecular; en estas circunstancias se recomienda repetir la prueba de HCV RNA de 3 a 6 meses posteriores.

La notificación incorrecta de un resultado falso positivo del anticuerpo genera ansiedad, miedo y deterioro en las relaciones interpersonales, así como incremento en los costos de la atención por consultas médicas y exámenes periódicos innecesarios;^{48,49} por lo que se debe(n) realizar la(s) prueba(s) complementaria(s) de manera refleja para confirmar o descartar el diagnóstico de hepatitis C.^{11-13,50} Es importante que el personal del área médica esté informado respecto a que los niveles por arriba de la unidad (índice S/CO ≥ 1) son obtenidos y reportados incluso en ausencia de infección por el HCV (resultados falsos positivos).

Actualmente estamos evaluando el costo-efectividad de tres estrategias para el diagnóstico de hepatitis crónica C en donadores de sangre con anti-HCV positivo; los resultados preliminares, demuestran la superioridad de la estrategia de diagnóstico que define las pruebas complementarias con base a los niveles del índice S/CO [(anti HCV bajo positivo \Rightarrow RIBA) y (anti-HCV alto positivo \Rightarrow HCV RNA)] (Estudio cosHCVir, Fondos Sectoriales, clave SALUD-2005-01-14158).

Propuesta para modificar el reporte del anti-HCV

El reporte del resultado del anti-HCV debe incluir la información completa de la prueba que permita la interpretación correcta de los resultados y la elección de las pruebas complementarias de acuerdo al nivel del índice S/CO del anticuerpo y el inmunoensayo utilizado. El modelo propuesto incluye la siguiente información (Cuadro IV):

- El anti-HCV se anota en la columna del examen; incluir el método y generación del inmunoensayo.
- En muestras con índice S/CO < 1 , reportar el resultado como no reactivo y el índice S/CO ≥ 1 como reactivo. Se deben evitar los términos "positivo" o "negativo" en el reporte del resultado
- El índice S/CO debe ser anotado en la columna de unidades (ésta información se obtiene directamente de los resultados que se muestran en la pantalla de los equipos).
- La interpretación del anti-HCV depende de la reactividad. Las muestras no reactivas no requieren pruebas complementarias. En las muestras reactivas (índice S/CO ≥ 1) se requiere realizar prueba(s) complementaria(s); la prueba se elige con base al índice S/CO y el inmunoensayo utilizado.

Cuadro IV. Modelo propuesto para reportar el resultado del anti-HCV

Reporte de laboratorio			
EXAMEN	RESULTADO	UNIDADES	INTERPRETACIÓN
Nombre: Médico tratante: Servicio:		Afilación o Registro: Externo Hospitalizado	No. cama: Fecha:
Guía de interpretación:			
Abbott MEIA AxSYM®HCV:	Índice S/CO de 1.0 a 50.0: realizar ensayo de inmunoblot recombinante (RIBA) Índice S/CO > 50 : realizar prueba de ácidos nucleicos (HCV RNA)		
Ortho ChLIA VITROS®HCV :	Índice S/CO de 1.0 a 19.99: realizar RIBA Índice S/CO ≥ 20 : realizar HCV RNA		
Abbott ChLIA PRSM®HCV:	Índice S/CO de 1.0 a 3.49: realizar RIBA Índice S/CO ≥ 3.5 : realizar HCV RNA		

- e) Se recomienda incluir la guía de interpretación para elegir la prueba complementaria con base al índice S/CO; el ejemplo se describe con los inmunoensayos que se utilizan más frecuentemente en México (Abbott MEIA AxSYM® HCV, Ortho ChLIA VITROS® HCV y Abbott ChLIA PRISM® HCV).

Conclusiones

El anti-HCV tiene un papel muy importante en el escrutinio y diagnóstico de la hepatitis C. Los profesionales de la salud de las áreas médicas (ejemplo: epidemiólogos, médicos generales, familiares, internistas, infectólogos, gastroenterólogos, patólogos clínicos, hematólogos, químicos, enfermeras y trabajadoras sociales) y no médicas (ejemplo: directivos y administradores) relacionados con la atención de los enfermos de hepatitis C deben aplicar y difundir el conocimiento para la adecuada interpretación de las pruebas de escrutinio y diagnóstico, así como la aplicación de los recursos institucionales y privados con base a la evidencia de resultados de investigación nacional e internacional en esta área. El registro y seguimiento epidemiológico de la hepatitis C deben ser dirigidos a los casos confirmados, es decir, con el anti-HCV verdadero positivo validado por las pruebas complementarias; además es importante señalar que aproximadamente 6 de cada 10 muestras con anticuerpo positivo corresponden a resultados falsos positivos en poblaciones de baja prevalencia en México (ejemplo: donadores de sangre). Por otro lado, se debe actualizar la normatividad (ejemplo: Norma Oficial Mexicana) con relación en la interpretación de las pruebas de escrutinio y diagnóstico de hepatitis C.

Otros temas importantes que no han sido abordados en esta revisión son el rendimiento de los otros inmunoensayos que se encuentran actualmente disponibles y el impacto de las MMM en el escrutinio de la hepatitis C en los bancos de sangre.

El Sistema de Salud Mexicano, al igual que otros, enfrenta grandes retos para la contención de costos, favoreciendo la eficiencia de los servicios de salud. La disponibilidad de pruebas precisas y estandarizadas del anti-HCV permiten la aplicación inmediata de las nuevas estrategias de escrutinio y diagnóstico de hepatitis C que aquí se proponen.

Agradecimientos

A Claudia Méndez, P.Kristian Rivera, Omar Noel Jiménez, Daniel Arroyo, Erendi Tinoco, José Guadalupe Toribio, Isaac Ruiz, Claudia Rebolledo, Laura Olivares, Sara Ruelas, Martha Alicia Alvarado, Jorge López Satow, Silvia Gasca Hernández y Mayela Sánchez Díaz, por su colaboración.

A Elsa Armida Gutiérrez Román, Jaime Eduardo Guzmán Pantoja y Diana Paulina Flores, por la corrección de estilo. A los integrantes del Grupo Mexicano de Estudio donHCVir

Referencias

1. Gordon FD. Cost-Effectiveness of Screening Patients for Hepatitis C. *Am J Med* 1999;107(6B):36-40.
2. Pawlotsky JM. Use and Interpretation of Virological Tests for Hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5)S1:65-73.
3. Richter SS. Laboratory Assays for Diagnosis and Management of Hepatitis C Virus Infection. *J Clin Microbiol* 2002;40(12):4407-4412.
4. Chou R, Clark EC, Helfand M. Screening for Hepatitis C Virus Infection: A Review of the Evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004;140(6):465-483.
5. CDC. Public Health Service inter-agency guidelines for screening donors of blood, plasma, organs, tissues, and semen for evidence of hepatitis B and hepatitis C. *MMWR* 1991;40(No. RR-4):1-17.
6. Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SSA2-1993 «para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos.»
7. Colin C, Lanoir D, Touzet S, Meyaud-Kraemer L, Baily F, Trepo C, et al. Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 2001;8(2):87-95.
8. Dufour DR, Talastas M, Fernández MDA, Harris B. Chemiluminescence assay improves specificity of hepatitis c antibody detection. *Clin Chem* 2003;49 (6):940-944.
9. Chevaliez S, Pawlotsky JM. Hepatitis C Virus Serologic and Virologic Tests and Clinical Diagnosis of HCV-Related Liver Disease. *Int J Med Sci* 2006;3:35-40.
10. Patel K, Muir AJ, McHutchinson JG. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C infection. *BMJ* 2006;332:1013-1017.
11. Alter MJ, Kuhnert WL, Finelli L. Centers for Disease Control and Prevention, Guidelines for Laboratory Testing and Result Reporting of Antibody to Hepatitis C Virus. *MMWR* 2003; 52(No.RR-3):1-16.
12. Courouce AM, Bouchardieu F, Girault A, Le Marrec N. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 1994;343:853-854.
13. Tobler LH, Tegtmeier G, Stramer SL, Quan S, Dockter J, Giachetti et al. Lookback on donors who are repeatedly reactive on first-generation hepatitis C virus assays: justification and rational implementation. *Transfusion* 2000;40:15-24.
14. Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, Yen-Lieberman B, Andersen J, Young S et al. Multilaboratory Comparison of Hepatitis C Virus Viral Load Assays. *J Clin Microbiol* 2006;44(5):1726-1732.
15. Hepatitis C Virus Encoded Antigen (Recombinant HCr43, c200, c100-3 and NS5) Abbott AxSYM Anti-HCV 3.0 (package insert). Abbott Park, IL: Abbott Laboratories, 2004.
16. Hepatitis C Virus Encoded Antigen (Recombinant C22-3, c200 and NS5) Ortho VITROS Anti-HCV (package insert). Ortho Raritan, NJ: Ortho-Clinical Diagnostics a Johnson and Johnson company, 2003.
17. Hepatitis C virus Encoded Antigen (Recombinant c100-3, HCr43, NS5) Abbott PRISM HCV 3.0 (package insert). Abbott Park, IL : Abbott Laboratories, 2002.
18. Scheiblauer H, El-Nageh M, Nick S, Fields H, Prince A, Diaz S. Evaluation of performance of 44 assays used in countries with limited resources for the detection of antibodies to hepatitis C virus. *Transfusion* 2006;46(5):708-718.
19. Tobler LH, Stramer SL, Lee SR, Masecar BL, Peterson JE, Davis EA, et al. Impact of HCV 3.0 EIA relative to HCV 2.0 EIA on blood-donor screening. *Transfusion* 2003;43:1452-1459.
20. Contreras AM. Anticuerpo a hepatitis C: ¿verdadero o falso positivo? Nuevas estrategias de diagnóstico. *Rev Invest Clin* 2006;58(2):153-160.
21. Contreras AM, Tinoco E, Celis A, Novelo B, Romero P, Carrada E, et al. Hepatitis C antibody intraassay correlation: is retest in duplicate necessary?. *Transfusion* 2007 (en prensa).
22. Carithers RL JR., Marquardt A, Gretch DR. Diagnostic Testing for Hepatitis C. *Semin liver/liver disease* 2000;20(2):159-171.
23. Goffin E, Pirson Y, Cornu C, Jadoul M, van Ypersele. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 1994;343:854.
24. Galei SA, Strong DM, Tegtmeier GE, Holland PV, Kuramoto IK, Kemper M, et al. Comparative yield of HCV RNA testing in blood donors screened by 2.0 versus 3.0 antibody assays. *Transfusion* 2002;42:1507-1513.
25. Husereau D, Bassett K, Koretz R. Interferon-based therapies for chronic hepatitis C virus infection: an assessment of clinical outcomes. Ottawa: Canadian Coordinating Office for Health Technology Assessment 2004; Technology Report no 47:1-52.
26. Dienstag J, Isselbacher. Acute viral hepatitis. In: Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jamenson J, ed. *Harrison's Principles of Internal Medicine* USA: Mc Graw Hill; 2005 pp. 1822-1838.
27. Dufour DR, Talastas M, Fernández MDA, Harris B, Strader DB, Seeff LB. Low-Positive Anti-Hepatitis C Virus Enzyme Immunoassay Results: An Important Predictor of Low Likelihood of Hepatitis C Infection. *Clin Chem* 2003;49(3):479-486.
28. Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Orland J, Murphy EL, Wright DJ, et al. Correlates of hepatitis C virus (HCV) RNA negativity among HCV-seropositive blood donors. *Transfusion* 2006;46:469-475.
29. Kiely P, Kay D, Parker S, Piscitelli L. The significance of third-generation HCV RIBA-indeterminate, RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. *Transfusion* 2004;44:349-358.
30. Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. Nucleic acid amplification testing of blood donors for

- transfusion-transmitted infectious diseases. *Transfusion* 2000;40:143-159.
31. **CDC news.** http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/c/sc_ratios.htm. Página electrónica; última actualización 01 Abril 2006. Revisada 23 Junio 2007.
32. **Oethinger M, Mayo DR, Falcone J, Barua PK, Griffith BP.** Efficiency of the Ortho VITROS assay for the detection of hepatitis C virus-specific antibodies increased by elimination of supplemental testing of samples with very low sample-to cutoff ratios. *J Clin Microbiol* 2005;43(5):2477-2480.
33. **Bossi V, Galli C.** Quantitative signal of anti-HCV by an automated assay predicts viremia in a population at high prevalence of hepatitis C virus infection. *J Clin Virol* 2004;30(1):45-49.
34. **Sookoian S, Lanari A.** Pruebas de laboratorio en pacientes infectados por el virus de la hepatitis C. En: Conceptos actuales en hepatitis C. Méndez N, Uribe M (Eds.) McGraw-Hill Inc. 2^a. Edición, México, D.F., México 2005, pp 85-103.
35. **Roth WK, Weber M, Buhr S, Drost C, Weichert W, et al.** Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. *Transfusion* 2002;42:862-868.
36. **Kleinman SH, Stramer SL, Brodsky JP, Caglioti S, Busch MP.** Integration of nucleic acid amplification test results into hepatitis C virus supplemental serologic testing algorithms: implications for donor counseling and revision of existing algorithms. *Transfusion* 2006;46:695-702.
37. **Operksalski EA, Mosley JW, Tobler LH, Fiebig EW, Nowicki MJ, Mimms LT, et al.** HCV viral load in anti-HCV-reactive donors and infectivity for their recipients. *Transfusion* 2003;43:1433-1441.
38. **Heyns ADP, Swanevelder JP, Lelie PN, Crookes RL, Busch MP.** The impact of individual donation NAT screening on blood safety – the South African experience. *ISBT Science Series* 2006;1:203-208
39. **González-Diez R.** NAT y seguridad de la transfusión sanguínea. *Gac Méd Méx* 2004;140(S3):86-89.
40. **Alnagy A, Al-Harthy S, Kaminski G, Al-Dahary S.** Detection of serum antibodies to hepatitis C virus in also-seronegative blood donors in Oman. *Med Princ Pract* 2006;15(2):111-113.
41. **Wong T, Lee SS.** Hepatitis C: a review for primary care physicians. *CMAJ* 2006; 174(5):649-659.
42. **Lauer G, Walker B.** Hepatitis C Virus Infection. *N Engl J Med* 2001;345(1):41-52.
43. **Poynard T, Mathurin P, Lai CL, Guyader D, Poupon R, Tainturier MH, et al.** A comparison of fibrosis progression in chronic liver diseases. *J Hepatol* 2003;38:257-265.
44. National Consensus of Hepatitis C. Mexican Association of Hepatology. *Ann Hepatol* 2002;1(3):148-154.
45. **Schroter M, Feucht HH, Schafer P, Zollner B, Polywka S, Laufs R.** Definition of false-positive reactions in screening for hepatitis C virus antibodies. *J Clin Microbiol* 1999;37:233-234.
46. **Martin P, Fabrizi F, Dixit V, Quan S, Brezina M, Kaufman E, et al.** Automated RIBA hepatitis C virus (HCV) strip immunoblot assay for reproducible HCV diagnosis. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):387-390.
47. **Chapko MK, Sloan KL, Davison JW, Dufour DR, Banksom DD, Rigsby M, et al.** Cost effectiveness of testing strategies for chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol* 2005;100:607-615.
48. **U.S. Preventive Services Task Force.** Screening for Hepatitis C Virus Infection in Adults: Recommendation Statement. *Ann Intern Med* 2004;140(6):462-464.
49. **Tynell E, Norda R, Bengt E, Sanner M, Andersson S, Bjorkman A.** False-reactive microbiologic screening test results in Swedish blood donors-how big is the problem? A survey among blood centers and deferred donors. *Transfusion* 2007; 47:80-89.
50. **Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB.** Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 2004;39:1147-1171.