

Primera experiencia con las pruebas de ácidos nucleicos (NAAT) en donantes de sangre en Colombia

*Olga Rincón Caballero¹, Beatriz Aristizábal Bernal², Gloria Barco Atehortua³,
Lisa Jaramillo Estrada⁴, Jhon Zuleta Tobón⁵, Sergio Jaramillo Velásquez⁶,
Grupo de Bancos de Sangre de Antioquia*

Resumen: Introducción: con el advenimiento de las pruebas moleculares de ácidos nucleicos (NAAT) a partir de 1998 para el virus de la hepatitis C (HCV), y posteriormente para el virus de la hepatitis B (HBV) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), se ha incrementado la seguridad relativa de la sangre comparada con las pruebas serológicas, y por tanto se ha reducido el período de ventana inmunológica. Estas pruebas se consideran obligatorias en Estados Unidos y en otros países del mundo. **Objetivo:** describir la experiencia del montaje de NAAT para HIV, HCV y HBV, detectar las dificultades y aplicar las medidas correctivas necesarias para mejorar la calidad de la sangre en Colombia. **Metodología:** estudio prospectivo en donantes de sangre de Antioquia para evaluar las pruebas NAAT como método de tamización. **Resultados:** se estudiaron un total de 4.890 donantes y se realizaron 14.670 pruebas en 208 mezclas de plasmas. La edad promedio de los 4.890 donantes fue de 33 años (SD $\pm 10,93$), 2.667 (54,5%) fueron hombres. No se encontraron unidades de sangre positivas por NAAT para HIV, HCV y HBV. **Conclusiones:** implementar las pruebas de NAAT en nuestro país requiere de alto volumen de muestras para lograr oportunidad, eficiencia y eficacia en el proceso. La corta vida y la urgencia con que se requieren las plaquetas exigen un montaje continuo de pruebas. El montaje necesita personal especializado y capacitado para sortear los diferentes inconvenientes que se presentan y contar con un laboratorio para realizar diagnóstico molecular que cumpla con las normas internacionales.

Palabras clave: NAAT, pruebas de ácidos nucleicos, banco de sangre, transfusión, virus de la inmunodeficiencia humana, hepatitis C, hepatitis B.

Rincón-Caballero O, Aristizábal-Bernal B, Barco-Atehortua G, Jaramillo-Estrada L, Zuleta-Tobón J, Jaramillo-Velásquez S, Grupo de Bancos de Sangre de Antioquia. Primera experiencia con las pruebas de ácidos nucleicos (NAAT) en donantes de sangre en Colombia. Medicina & Laboratorio 2009, 15: 27-35.

Módulo 19 (Investigación), número 4. Editora Médica Colombiana S.A., 2009®

Recibido el 1 de octubre, 2008; aceptado el 16 de octubre, 2008.

1. Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.
2. Bacterióloga y Laboratorista Clínica. MSc, PhD. Coordinadora Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.
3. Bacterióloga y Laboratorista Clínica. Coordinadora Banco de Sangre, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.
4. Ingeniera Biomédica. Coordinadora de la Unidad de Investigaciones, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.
5. Médico Especialista en Ginecología y Obstetricia, Epidemiología. Unidad de Investigaciones, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.
6. Médico Especialista en Laboratorio Clínico y Patología. Jefe Laboratorio Clínico y Patología, Hospital Pablo Tobón Uribe. Medellín, Colombia.

Introducción

En las últimas dos décadas se ha logrado reducir el riesgo residual de la transmisión de las enfermedades infecciosas y detectar infecciones virales durante el período de ventana inmunológica, las cuales no son detectadas por las pruebas serológicas de rutina pero sí por pruebas moleculares como la detección de ácidos nucleicos (NAAT por *Nucleic Acid Amplification Techniques*). La reducción media estimada del período de ventana con NAAT es del 42% (de 59 a 34 días) para el virus de la hepatitis B (HBV), 50% (de 22 a 11 días) para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y 66% (de 66 a 23 días) para el virus de la hepatitis C (HCV), disminuyendo significativamente el riesgo residual de transmisión de agentes infecciosos por transfusión [1-8].

Los bancos de sangre en Colombia iniciaron el control de enfermedades transmitidas por la sangre en la década de 1950 a 1960 con la prueba de cardiolipina VDRL que detecta anticuerpos anti-*Treponema pallidum* (sífilis); posteriormente, en 1978, se adicionó el rastreo de antígeno de superficie para hepatitis B (HBsAg). Los decretos 559 de 1991 y 1571 de 1993, expedidos por el antes llamado Ministerio de Salud, establecieron las pruebas necesarias que se deben realizar en las unidades de sangre, definiendo como obligatorias las pruebas de detección de anticuerpos anti-HIV tipos 1 y 2, el HBsAg, los anticuerpos anti-hepatitis C, los anticuerpos anti-*Treponema pallidum* y, finalmente, mediante la resolución 01738 de mayo de 1994, se adoptó la prueba de anticuerpo anti-*Trypanosoma cruzi*, para la enfermedad de Chagas [9].

En Colombia aún no se ha introducido la obligatoriedad de realizar las pruebas de NAAT para HIV, HCV, HBV en las donaciones de banco de sangre y por lo tanto aún existe riesgo de transmisión de infección viral a los pacientes que reciben sangre de donantes en período de ventana inmunológica. Las pruebas NAAT ofrecen la opción de mejorar la calidad de la sangre de los bancos nacionales a un costo razonable.

El objetivo de este trabajo es presentar los resultados de la primera experiencia de utilización de las pruebas de ácidos nucleicos (NAAT) en Colombia en donantes de sangre, en los diferentes bancos de sangre de Antioquia, monitorear las infecciones anteriormente mencionadas y presentar las nuevas tecnologías que pueden ofrecer mejoras importantes para el diagnóstico, tamización de la sangre y monitoreo de la enfermedad, particularmente en países en vía de desarrollo.

Materiales y métodos

Se solicitó y obtuvo aprobación del Comité de Ética institucional para la realización del estudio, al igual que el consentimiento informado de cada donante del banco de sangre para la participación en el estudio.

- **Tipo de estudio:** descriptivo, prospectivo.
- **Sitio:** Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Pablo Tobón Uribe, hospital de referencia de cuarto nivel en la ciudad de Medellín, Colombia.
- **Recolección:** se realizó reunión con todos los bancos de sangre para explicar, motivar y lograr la participación de todos, fueron entregados a cada banco los formatos e insumos necesarios para recolectar la información y las muestras de sangre total en tubos con EDTA. En Antioquia, la entrevista de selección de donantes fue unificada por la resolución 7238 de la Gobernación de Antioquia. Sin embargo, los criterios de autoexclusión son diferentes para cada banco de sangre [10]. Las muestras se recolectaron entre enero de 2006 y mayo de 2006.

Una vez seleccionado el donante, al finalizar la flebotomía además de los tubos tomados normalmente para las pruebas de rutina, se recolectó un tubo de sangre con EDTA teniendo

en cuenta que debía coincidir el número del tubo con el código de la encuesta del donante. Todas las muestras se manipularon como si contuvieran agentes potencialmente infecciosos. Los tubos se identificaron con nombre, apellidos y cédula de ciudadanía.

Las muestras se almacenaron hasta obtener los resultados de serología para HIV, HBV y HCV de los respectivos bancos de sangre, con el fin de procesar por NAAT únicamente los donantes con serologías negativas. Además, las unidades de sangre se retuvieron en los respectivos bancos de sangre hasta su liberación con las pruebas NAAT. La técnica requiere 10 mezclas de plasmas de 24 donantes para realizar un montaje completo de 240 muestras por anillo de prueba, circunstancia que retrasó el resultado de las pruebas.

- **Bancos de Sangre:** los bancos de sangre que participaron en el estudio fueron el Hospital Pablo Tobón Uribe, Hospital General de Medellín, Clínica El Rosario-Centro de Investigaciones Médicas de Antioquia (CIMA), Hospital Antonio Roldán Betancur de Apartadó, Clínica Las Américas, E.S.E. Rafael Uribe Uribe, Clínica Medellín, Clínica Cardiovascular Santa María, Cruz Roja de Antioquia y Hospital San Juan de Dios de Rionegro.
- **Almacenamiento:** los tubos de sangre con EDTA tomados a cada uno de los donantes se centrifugaron a 2.500 rpm por 20 minutos y luego se almacenaron a temperatura de 2°C a 8°C por máximo 5 días.
- **Procesamiento:** la preparación de los reactivos y los procedimientos del Cobas Amplicor® se realizaron siguiendo las especificaciones de la casa comercial.

Las mezclas de plasmas de los donantes se realizaron usando el pipeteador Hamilton micro lab AT2; las mezclas primarias eran de 24 donantes, si el resultado era positivo en alguna de las pruebas, se procedía a hacer la resolución secundaria que consistía en 4 mezclas de 6 muestras de donantes cada uno; en caso de que alguna fuera positiva se procedía a realizar la resolución terciaria, en la cual se procesaba de manera individual cada una de las muestras de la resolución secundaria.

Para hacer un montaje de pruebas NAAT se requieren 240 plasmas que corresponden a 240 unidades de sangre, esto hizo que al principio del estudio, mientras se adaptaba la logística y se daba una mayor adherencia de los bancos de sangre participantes, el tiempo para obtener los resultados de NAAT fuera de 10 días. Este tiempo mejoró considerablemente a dos días al final del estudio por la experiencia alcanzada y por la mayor participación de los bancos de sangre.

Para la obtención de los ácidos nucleicos se realizó la lisis de las células usando un buffer o tampón de lisis junto con el control interno para la monitorización del rendimiento del ensayo en cada una de las pruebas individuales, luego por diferentes centrifugaciones y precipitaciones con alcoholes se separó el material genético, el cual se resuspendió en 200 µL de diluyente y se almacenó a -70°C hasta su uso.

Para la amplificación se preparó el *master mix* el cual tiene la enzima AmpErase® (uracil-N-glicosilasa) para evitar la contaminación potencial con material previamente amplificado (amplícón). Se sirvieron 50 µL del *master mix* con 50 µL de la mezcla de plasmas o de los controles. La amplificación y detección de las pruebas se hizo en un equipo Cobas Amplicor®.

- **Variables:** se tuvieron en cuenta las siguientes variables: cuantitativas de razón: edad de los donantes, tiempo para la obtención del resultado NAAT, días de liberación de las unidades de sangre. Cualitativas nominales: género, resultado de la serología, resultados NAAT, donantes repetitivos voluntarios, donantes de primera vez, por reposición, dirigidos y autólogos.

- **Análisis de datos:** la descripción de las características generales de la población se presentó en una tabla de resumen donde las variables cualitativas se expresan en frecuencia absoluta y porcentaje, y las variables cuantitativas se resumen con promedio con sus respectivas desviaciones estándar. Los resultados se analizaron en el paquete estadístico Graph Pad Prisma 3.0.

Resultados

El tiempo promedio para obtener el resultado desde la recepción de la muestra en el Hospital Pablo Tobón Uribe hasta el día del informe al respectivo banco de sangre fue de 4,22 días y los días en promedio desde la fecha de donación en los respectivos bancos de sangre hasta la fecha del informe fue de 6,41 días.

El porcentaje de muestras aportadas por cada banco de sangre fue el siguiente Hospital Pablo Tobón Uribe 37,3%, Hospital General de Medellín 32,1%, Clínica El Rosario-Centro de Investigaciones Médicas de Antioquia (CIMA) 12,7%, Hospital Antonio Roldán Betancur de Apartadó 11%, Clínica Las Américas 2,6%, E.S.E. Rafael Uribe Uribe 1,8%, Clínica Medellín 0,9%, Clínica Cardiovascular Santa María 0,9%, Cruz Roja de Antioquia 0,5% y Hospital San Juan de Dios de Rionegro 0,2%.

De los 4.890 donantes estudiados de los diferentes banco de sangre de Antioquia el 45,5% (2.223) eran mujeres y 54,5% (2.667) hombres. La edad promedio fue de 33 años ($SD \pm 10,93$). De los 4.890 donantes, el 37,9% (1.856) era primera vez que donaba sangre y el 61,8% (3.020) eran donantes repetitivos, del total de encuestas 0,3% (14) no tenían dato de donaciones previas.

Del total de donantes, 2.773 (56,7%) eran del tipo de donante voluntario, 1.997 (40,8%) eran donantes de reposición; 26 (0,6%) de donación dirigida, 5 (0,1%) de donación autóloga y 89 (1,8%) de las encuestas no tenían el dato. De los 4.890 donantes, el 36,1% (1.765) fueron donantes voluntarios repetitivos y el 20,6% (1.008) fueron donantes voluntarios por primera vez. La distribución de los donantes se observa en la **figura 1**.

En este trabajo no se detectó por NAAT ningún donante positivo. El total de falsos positivos en las mezclas de resolución primaria debido al error humano (contaminación en la extracción con controles positivos) fue de cuatro pruebas para hepatitis B (0,08%) y de una prueba para hepatitis C (0,02%), y debido a fallas del equipo (falla en una de las mangueras que realizan el lavado de las copas de reacción) fue de 12 pruebas para HBV (0,25 %), 3 para HCV (0,06%), y 6 pruebas falsos positivos para HIV (0,12 %).

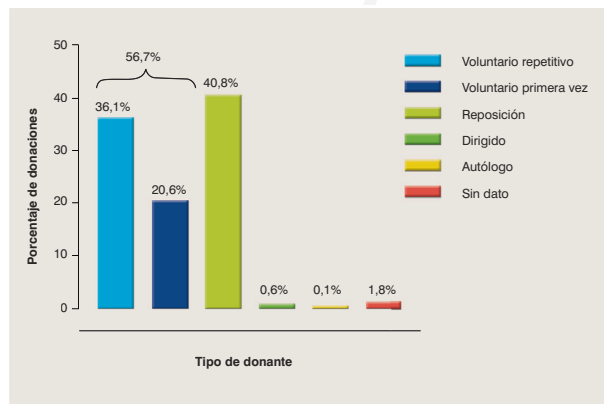


Figura 1. Distribución del tipo de donante.

A los cuatro donantes positivos por NAAT (y con serología negativa según el respectivo banco de sangre) para hepatitis B se les realizó seguimiento para esclarecer si éstos se encontraban en ventana inmunológica en el momento de su donación o si presentaban pruebas positivas por NAAT pero hacían parte de una hepatitis resuelta o para confirmar un falso positivo por NAAT. A los cuatro donantes se les repitieron las serologías con una técnica diferente, encontrando como resultado una de ellas positiva, lo que podría ex-

plicarse debido al uso de diferentes pruebas serológicas. Las bolsas de sangre de donantes con resultados falsos positivos por NAAT o con una nueva serología positiva fueron descartadas. La identificación de los falsos positivos debidos al error humano se logró porque después de realizar la resolución secundaria y terciaria con resultados positivos, se tomó nueva muestra a los donantes para confirmar estos resultados por serología y con la prueba molecular cuantitativa para HBV, siendo los resultados por ambas pruebas negativos (serología negativa y NAAT menor de 300 copias/mL). Se realizó seguimiento a tres de los donantes dos meses después para hacer la detección molecular cuantitativa de HBV y a los dos meses para el donante que había dado positivo para hepatitis C, todos con resultados negativos. Se concluyó que los resultados iniciales fueron debidos a contaminación de las muestras por proximidad al control positivo.

La detección de los falsos positivos debido a fallas en el equipo fue de fácil identificación, ya que todas las mezclas primarias de un mismo montaje dieron positivas, incluso el control negativo, y al realizar un nuevo montaje se obtuvieron resultados válidos de los controles y muestras.

Entre las dificultades para la liberación rápida y eficiente de las unidades captadas estuvo la necesidad de contar con el resultado negativo por ELISA (HIV, HCV y HBV) antes del montaje por NAAT, y luego permanecer en cuarentena hasta la fecha del informe; además, el volumen de muestra necesaria exigía 3 mL de plasma teniendo que utilizar dos tubos de 5 mL al inicio del estudio, situación que se mejoró con la implementación de tubos EDTA de 10 mL.

Discusión

La importancia de la implementación de las pruebas NAAT en bancos de sangre radica en poder detectar a los donantes que se encuentran en período de ventana inmunológica [11-13] y así disminuir el riesgo de infección en las transfusiones [14-17]. La alta sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite detectar donaciones potencialmente infecciosas contenidas en la mezcla de plasmas de donantes, aun cuando la mezcla contenga un único donante virémico [18, 19]. El principal problema radica en la fácil contaminación de las pruebas cuando se incluyen unidades que por serología son positivas; de aquí la importancia de realizarle las pruebas de NAAT únicamente a las unidades que tienen la tamización previa con serología negativa, así como también tener en cuenta las normas estrictas de seguridad de un laboratorio para realizar el diagnóstico molecular [18, 20].

Los donantes fueron en su mayoría adultos jóvenes, con vida actividad sexual activa, lo que incrementa el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas en las transfusiones. A pesar del control que se realiza con la encuesta y la autoexclusión, no se puede garantizar la seguridad de la sangre [21-23]. Lo ideal en las donaciones, son los donantes voluntarios repetitivos, debido a que tienen conciencia de la importancia de la donación de sangre y deciden tener una vida saludable [24]; en el estudio las pruebas de NAAT se realizaron a los donantes con previa serología negativa. Este tipo de donantes representó el 36,1% (1.765) de los tamizados, quienes sumados a los voluntarios de primera vez, 20,6% (1.008), representaron un 56,7% de donantes voluntarios, variable que en parte explica porqué no se obtuvieron pruebas positivas en nuestro estudio para HIV, HCV y HBV por NAAT, como también lo explicarían la selección de procedimientos más controlados en los bancos de sangre.

El tiempo promedio de 4,42 días para obtener el resultado fue relativamente largo para nuestro estudio debido a la dificultad para alcanzar 240 muestras de donantes por montaje de prueba; sin embargo, el tiempo de liberación de la sangre se puede mejorar si las pruebas de NAAT se establecen como obligatorias en nuestro país. En este caso deberán existir algunos centros de referencia para la realización de las mismas y así recolectar mayor número de muestras de donantes para hacer la resolución primaria. Aun con bancos de sangre que reciben un número importante de donantes, se hace difícil manejar las plaquetas, ya que de los cinco días de caducidad se pierden, al menos, dos días.

En los países latinoamericanos, 33 años más tarde de la resolución de la Organización Mundial de la Salud, WHA 28.72 de 1975, y a pesar del progreso logrado en los bancos de sangre, la prevención de las enfermedades infecciosas en las transfusiones de sangre es precaria, debido a que los recursos no están disponibles ni tampoco las normas y estrategias para un adecuado manejo [25, 26].

Así los bancos de sangre que son formalmente responsables de llevar a cabo las actividades de implementación y promoción de la donación, almacenamiento, procesamiento, distribución y transfusión deberían depender de un programa nacional de bancos de sangre y por lo tanto ser el gobierno el eje controlador de la seguridad de las transfusiones de sangre y sus derivados.

Aunque este estudio muestra que los criterios de selección de donantes en los bancos participantes ofrecen seguridad, se debe tener en cuenta que no en todos los bancos de sangre del país se trabaja con los mismos estándares de calidad ni tienen la misma tecnología, y que la sensibilidad de las pruebas serológicas puede variar representando un riesgo de infección por transfusión. Como el ideal es estar lo más cercano a cero en el riesgo de transfusión, sería de gran ayuda la implementación de las pruebas NAAT en la totalidad de los bancos de sangre del país, pero esto implica un compromiso grande por parte del gobierno y el diseño e implementación de una logística que permita la realización de las pruebas NAAT sin sacrificar la disponibilidad de los componentes sanguíneos [27].

A pesar de los numerosos controles de esterilidad seguidos para las pruebas moleculares, los falsos positivos que se presentaron durante el desarrollo del trabajo debidos a contaminaciones de las muestras con los controles positivos sugieren que todo resultado positivo debe ser confirmado y las pruebas deben ser realizadas en laboratorios que sigan las normas internacionales para diagnóstico molecular con personal altamente calificado, para saber analizar las diferencias entre contaminación y pruebas realmente positivas.

La búsqueda de HCV y HIV por NAAT, principalmente en mezcla de plasmas, se está realizando en la mayoría de los países avanzados [5, 14]. Tras su implementación, el riesgo se ha reducido aproximadamente a un caso por dos millones de transfusiones para el HCV y HIV [28]. La explicación obvia para que en este trabajo no se haya podido demostrar la importancia de la implementación de esta prueba es que se requiere un número mucho mayor de pruebas para poder detectar los infrecuentes casos de donantes en ventana inmunológica, que aunque poco frecuentes, representan un riesgo con todas las consecuencias negativas para el eventual receptor [29-31]. El número estimado de transfusiones potencialmente contaminadas por país y por año debido a la falta de pruebas de tamización en Latinoamérica, se muestra claramente en el estudio de Schmunis y Cruz del 2005 [25]. En Colombia en el 2002, la probabilidad de transfusiones contaminadas en 424.899 donantes por año para HBV o HIV era de cinco y para HCV era de 14, haciendo Colombia parte de los tres países de Latinoamérica, junto con Guatemala y Bolivia, con mayor riesgo de contaminación por transfusión en un año. Lo que no deja ningún margen de duda que la puesta en marcha de las pruebas NAAT para las donaciones de sangre se hace obligatoria.

Como futuras perspectivas están la mayor automatización que permitirá el análisis de muestras individuales con el consiguiente incremento en sensibilidad y “cierre del período de ventana”. El ideal será entonces llegar a tener pruebas de PCR para los agentes infecciosos antes mencionados y poderlas realizar a todas las donaciones del banco de sangre en Colombia.

Agradecimientos

A Productos Roche por la cofinanciación del proyecto. Al personal de los diferentes bancos de sangre en especial: Hospital General de Medellín (HGM): Libia Victoria Gallo O., Martha Isabel Sierra V., Carmen Cecilia Lopera M.; Clínica El Rosario-CIMA: Carlos Robledo R., Juan Carlos

Pérez R.; Clínica Las Américas: Esteban Echavarría E., Lina María Buitrago; Hospital Antonio Roldán Betancur de Apartadó (HARB): Martha Pinto, Dora I. Restrepo M.; Hospital San Juan de Dios de Rionegro (HSJDR): Luz Elena Rendón, María Isabel Franco; ESE Rafael Uribe Uribe: Sergio Galindo; Clínica Medellín: Teresita Lopera, Diana Hernández; Clínica Cardiovascular Santa María: María Isabel Múnera, Mónica Blandón; Cruz Roja de Antioquia: Johanna Daza; Hospital Pablo Tobón Uribe: Jorge Donado, Angela P. Estrada, Beridiana Montoya, Judith García, Shirley Sandoval y Jorge Luis Escobar.

Declaración de conflictos de interés: Los autores certifican que han contribuido directamente al contenido intelectual de este manuscrito, a la génesis y análisis de sus datos, por lo cual están en condiciones de hacerse públicamente responsables de él y aceptan que sus nombres figuren en la lista de autores. Los autores certifican que el artículo arriba mencionado es trabajo original y no ha sido previamente publicado, excepto en forma de resumen.

Financiación: Este proyecto fue financiado por el Hospital Pablo Tobón Uribe y Productos Roche.

Abstract: Introduction: with the advent of molecular nucleic acid amplification test (NAAT) starting in 1998 for hepatitis B virus (HBV), and later for hepatitis C virus (HCV) and human immunodeficiency virus (HIV), there has been an increase in the relative safety of the blood compared to the serological tests, and therefore a reduction in the immune window period has been achieved. These tests are mandatory in the United States and in other countries around the world. **Objective:** To describe the experience of NAAT for HIV, HCV and HBV, detect problems and implement the necessary corrective measures to improve blood quality in Colombia. **Methods:** Prospective study on blood donors of Antioquia to evaluate NAAT as a screening method. **Results:** A total of 4.890 donors and 14.670 tests were screened in 208 pools of plasmas. Age average of the 4.890 donors was 33 years ($SD \pm 10,93$), 2.667 (54,5%) were men. No positive blood units were found by NAAT for HIV, HBV and HCV. **Conclusions:** implement NAAT testing in our country requires high volume of samples to ensure timeliness, efficiency and effectiveness in the process. The short life and the urgency of platelets require continuous running of the tests. There is a need for trained personnel to overcome the various inconveniences that arise and to have a laboratory to conduct molecular diagnosis that meets interNAATional standards.

Key words: NAAT, nucleic acid test, blood bank, transfusion, HIV, HCV, HBV.

Rincón-Caballero O, Aristizábal-Bernal B, Barco-Atehortua G, Jaramillo-Estrada L, Zuleta-Tobón J, Jaramillo-Velásquez S, Grupo de Bancos de Sangre de Antioquia. First experience with nucleic acid amplification test (NAAT) in blood donors in Colombia. *Medicina & Laboratorio* 2009, 15: 27-35.

Module 19 (Research), number 4. Editora Médica Colombiana S.A., 2009®.

Received on October 1, 2008; accepted on October 16, 2008.

Referencias

1. Candido A, Chionne P, Milazzo L, Dettori S, Madonna E, Taffon S, et al. Nucleic acid testing (NAAT) for HCV RNA in Italian transfusion centres: an external quality assessment. *J Clin Virol* 2008; 41: 277-282.
2. Makroo RN, Choudhury N, JaganNAATHan L, Parihar-Malhotra M, Raina V, Chaudhary RK, et al. Multicenter evaluation of individual donor nucleic acid testing (NAAT) for simultaneous detection of human immunodeficiency virus -1 & hepatitis B & C viruses in Indian blood donors. *Indian J Med Res* 2008; 127: 140-147.
3. Piquet Y, Ivanovic Z, Laperche S, Pillonel J, Cristol G, Jeanne M, et al. Nucleic acid amplification

- testing detection of an HIV-1 infection in a blood donor during the pre-seroconversion window period. *Transfus Med* 2007; 17: 147-148.
4. **Nantachit N, Thaikruea L, Thongsawat S, Leertrakool N, Fongsatikul L, Sompan P, et al.** Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand. *Transfusion* 2007; 47: 1803-1808.
5. **Goodman C, Chan S, Collins P, Haught R, Chen YJ.** Ensuring blood safety and availability in the US: technological advances, costs, and challenges to payment-final report. *Transfusion* 2003; 43: 35-46S.
6. **InterNAATional Forum.** Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology. *Vox Sang* 2002; 82: 87-111.
7. **Pillonel J, Le Marrec N, Girault A, David D, Laperche S.** [Epidemiological surveillance of blood donors and residual risk of blood-borne infections in France, 2001 to 2003]. *Transfus Clin Biol* 2005; 12: 239-246.
8. **Pillonel J, Laperche S.** Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAAT). *Euro Surveill* 2005; 10: 5-8.
9. **González-Díez R.** NAAT y seguridad de la transfusión sanguínea. *Gac Méd Méx* 2004; 140: 86-89.
10. **Gobernación de Antioquia.** Dirección Seccional de Salud. Resolución No. 7238 del 28 de junio de 2005.
11. **Soldan K, Davison K, Dow B.** Estimates of the frequency of HBV, HCV, and HIV infectious donations entering the blood supply in the United Kingdom, 1996 to 2003. *Euro Surveill* 2005; 10: 17-19.
12. **Velati C, Fomiatti L, Baruffi L, Romano L, Zanetti A.** Impact of nucleic acid amplification technology (NAAT) in Italy in the three years following implementation (2001-2003). *Euro Surveill* 2005; 10: 12-14.
13. **Yoshikawa A, Gotanda Y, Itabashi M, Minegishi K, Kanemitsu K, Nishioka K.** HBV NAAT positive [corrected] blood donors in the early and late stages of HBV infection: analyses of the window period and kinetics of HBV DNA. *Vox Sang* 2005; 88: 77-86.
14. **Laperche S.** Blood safety and nucleic acid testing in Europe. *Euro Surveill* 2005; 10: 3-4.
15. **Niederhauser C, Schneider P, Fopp M, Ruefer A, Levy G.** Incidence of viral markers and evaluation of the estimated risk in the Swiss blood donor population from 1996 to 2003. *Euro Surveill* 2005; 10: 14-16.
16. **Offergeld R, Faensen D, Ritter S, Hamouda O.** Human immunodeficiency virus, hepatitis C and hepatitis B infections among blood donors in Germany 2000-2002: risk of virus transmission and the impact of nucleic acid amplification testing. *Euro Surveill* 2005; 10: 8-11.
17. **Owusu-Ofori S, Temple J, Sarkodie F, Anokwa M, Candotti D, Allain JP.** PredoNAAT screening of blood donors with rapid tests: implementation and efficacy of a novel approach to blood safety in resource-poor settings. *Transfusion* 2005; 45: 133-140.
18. **Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Caglioti S, 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: 760-768.
19. **Lelie PN, van Drimmelen HA, Cuypers HT, Best SJ, Stramer SL, Hyland C, et al.** Sensitivity of HCV RNA and HIV RNA blood screening assays. *Transfusion* 2002; 42: 527-536.
20. **Hadgu A, Dendukuri N, Hilden J.** Evaluation of nucleic acid amplification tests in the absence of a perfect gold-standard test: a review of the statistical and epidemiologic issues. *Epidemiology* 2005; 16: 604-612.
21. **Brojer E, Gronowska A, Medynska J, Grabarczyk P, Mikulska M, Letowska M, et al.** The hepatitis C virus genotype and subtype frequency in hepatitis C virus RNA-positive, hepatitis C virus antibody-negative blood donors identified in the nucleic acid test screening program in Poland. *Transfusion* 2004; 44: 1706-1710.
22. **Busch MP.** Should HBV DNA NAAT replace HBsAg and/or anti-HBc screening of blood donors? *Transfus Clin Biol* 2004; 11: 26-32.
23. **Kuhns MC, Kleinman SH, McNamara AL, Rawal B, Glynn S, Busch MP.** Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion* 2004; 44: 1332-1339.
24. **Lopez RA, Romero-Estrella S, Infante-Ramirez L, Mendez-Aquino JS, Berron-Ruiz P, Morales-Alfaro NA, et al.** Hepatitis C seroprevalence in accepted versus deferred blood-donor candidates evaluated by medical history and self-exclusion form. *Transfusion* 2004; 44: 1344-1349.

25. **Schmunis GA, Cruz JR.** Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 12-29.
26. **Seed CR, Kiely P, Keller AJ.** Residual risk of transfusion transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, hepatitis C virus and human T lymphotropic virus. *Intern Med J* 2005; 35: 592-598.
27. **Jose M, Gajardo R, Jorquera JI.** Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage. *Biologicals* 2005; 33: 9-16.
28. **Marshall DA, Kleinman SH, Wong JB, AuBuchon JP, Grima DT, Kulin NA, et al.** Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood doNAATions for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sang* 2004; 86: 28-40.
29. **Dodd RY.** Current safety of the blood supply in the United States. *Int J Hematol* 2004; 80: 301-305.
30. **Gonzalez M, Regine V, Piccinini V, Vulcano F, Giampaolo A, Hassan HJ.** Residual risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in Italy. *Transfusion* 2005; 45: 1670-1675.
31. **Alvarez do Barrio M, Gonzalez Diez R, Hernandez Sanchez JM, Oyonarte Gomez S.** Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, and impact of nucleic acid testing. *Euro Surveill* 2005; 10: 20-22.

