

# Riesgo residual de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en bancos de sangre e impacto del cribado con pruebas de detección de ácidos nucleicos

 Localizador web  
Artículo 88.263

Ana Machuca e Indira Hewlett

Laboratorio de Virología Molecular. CBER/FDA. Bethesda. Maryland. EE.UU.

**El riesgo actual de adquirir una infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) a través de la recepción de una transfusión de sangre o derivados sanguíneos es muy reducido en la mayoría de los países desarrollados. El elevado nivel de bioseguridad alcanzado en las transfusiones de sangre en los últimos años se debe principalmente al éxito en la mejora de los métodos de selección de los donantes, al igual que al adelanto tecnológico de las pruebas de detección e inactivación de agentes infecciosos en sangre y derivados sanguíneos. En este sentido, la implantación de métodos de detección de ácidos nucleicos (NAT) para el VIH y el virus de la hepatitis C (VHC) en los bancos de sangre de EE.UU. ha supuesto un avance decisivo a la hora de reducir al mínimo el riesgo residual de transmisión de estas infecciones a través de transfusiones sanguíneas. El análisis global de los primeros 4 años de experiencia en el uso de NAT en bancos de sangre de EE.UU. plantea la posibilidad de su implantación en bancos de sangre europeos, dado el mayor rendimiento alcanzado en la detección de infecciones en individuos que se encuentran en estadios muy tempranos de la infección, cuando aún no se ha desarrollado una respuesta serológica de anticuerpos.**

**Palabras clave:** VIH. Transfusión. Transmisión. Bancos de sangre. NAT.

Residual risk of human immunodeficiency virus infection in blood banks. Impact of screening with nucleic acid tests

**In most developed countries of the world, the risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by transfusion of blood and blood products is extraordinarily small. This level of blood safety has been accomplished by successive refinement in donor screening and testing procedures for the detection and inactivation of different infectious agents in blood and blood products. In USA, the recent introduction of nucleic acid techniques (NAT) in blood banks for the detection of HIV and hepatitis C virus (HCV) has meant a great advance in decreasing the residual risk of HIV/HCV transmission by blood transfusion.**

**In general, after analyzing the first four-years of NATs experience in US blood banks, the introduction of NATs in European blood centers could be considered, since this technique has shown improved output to detect donations from individuals in the very early stages of infection before detectable serologic response has been developed.**

**Key words:** HIV. Transfusion. Transmission. Blood banks. NATs.

La posibilidad de disponer de métodos sensibles y específicos al 100% para la detección de infecciones bacterianas y virales en sangre es un objetivo que se lleva persiguiendo intensamente durante las últimas dos décadas en la mayoría de los bancos de sangre de países desarrollados de todo

el mundo. De hecho, el riesgo de contraer cualquier infección a partir de una unidad de sangre ha disminuido hasta en cuatro órdenes de magnitud a lo largo de los últimos 30 años<sup>1</sup>. A pesar del continuo esfuerzo en prevenir la transmisión de infecciones por medio de la aplicación de una rigurosa selección de los donantes y utilizando métodos de cribado cada vez más sensibles, aún existe un riesgo de transmisión de agentes infecciosos a través de las transfusiones de sangre y derivados sanguíneos, el denominado riesgo residual<sup>2</sup>. Este riesgo está directamente relacionado con el «período ventana», definido como el período, generalmente corto, que transcurre entre el momento de la adquisición de la infección y la detección de marcadores serológicos sanguíneos de dicha infección.

Esta revisión está enfocada principalmente en el análisis del riesgo residual actual de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en bancos de sangre de EE.UU., examinando la influencia y el impacto de la implantación de pruebas de detección de ácidos nucleicos. Se toma como referencia EE.UU. debido a sus 4 años de experiencia en el cribado de las donaciones sanguíneas con dichas técnicas, analizando una media de 14 millones de donaciones por año. En diciembre de 1999, los centros para el control de enfermedades de EE.UU. (CDC) comunicaron un total de 9.000 casos acumulados de sida debidos a la transfusión de sangre o derivados sanguíneos que no habían sido previamente cribados frente al VIH<sup>3</sup>. Se estima que la mitad de la población de hemofílicos en EE.UU. se infectó con el VIH previamente al desarrollo y la implantación de métodos efectivos de inactivación viral en concentrados de factores de coagulación<sup>4</sup>. En ciertas áreas como San Francisco, donde la epidemia de VIH tuvo un gran impacto desde el comienzo, se ha estimado que el riesgo de infección por el VIH asociado a transfusión previa a la implantación de la técnicas de cribado de anticuerpos alcanzó hasta un 1,1% por unidad transfundida<sup>5</sup>.

La sucesiva introducción de cuestionarios dirigidos a identificar sujetos con comportamientos de riesgo para el VIH<sup>6-8</sup>, pruebas de detección de anticuerpos<sup>8,9</sup> y el desarrollo de técnicas efectivas de esterilización e inactivación viral en plasma y derivados plasmáticos han eliminado actualmente las transfusiones como vía de transmisión del VIH.

## Educación del donante y métodos iniciales de cribado del VIH en bancos de sangre

Los bancos de sangre en EE.UU. plantean un enfoque multidireccional a la hora de minimizar la probabilidad de recibir donaciones de sangre a partir de sujetos con factores de riesgo para la infección por el VIH y otros patógenos sanguíneos. La medida más significativa destinada a reducir el riesgo de transmisión de infecciones mediante la transfusión fue la generación de un sistema de donaciones voluntarias a escala nacional, de cara a eliminar la remuneración

Correspondencia: Dra. A. Machuca.  
Center for Biologics Evaluation & Research, FDA.  
Bldg. 29B, Rm. 4E16 (HFM 315). 8800 Rockville Pike.  
Bethesda, MD 20892. EE.UU.  
Correo electrónico: machuca@cber.fda.gov

Recibido el 10-3-2003; aceptado para su publicación el 22-4-2003.

económica por donación de sangre. Esta medida fue adoptada con anterioridad a la epidemia del VIH, debido a la existencia de un índice muy elevado de hepatitis postransfusionales<sup>10</sup>. Este cambio, junto con la implantación de técnicas de detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, se relacionó directamente con un acusado descenso en la incidencia de hepatitis virales en receptores de transfusiones sanguíneas<sup>11</sup>.

A partir de 1983, una vez conocida la epidemia del VIH, la agencia americana encargada de la regulación y el control de productos relacionados con la salud pública, Food and Drug Administration (FDA), puso en marcha un plan educativo en el cual cada donante es dotado de información impresa sobre los síntomas clínicos de la infección por el VIH/sida y los factores de riesgo específicos para adquirir la infección<sup>6-8</sup>. De cara a evitar que los bancos de sangre sean utilizados como método indirecto de conocimiento del estatus frente al VIH de cada individuo, se facilita información sobre centros clínicos que realizan pruebas diagnósticas del VIH<sup>7,8</sup>. De manera adicional, para asegurarse de que los donantes realmente lean la información facilitada, la FDA recomendó una entrevista personal con los profesionales sanitarios, incluyendo preguntas directas sobre los posibles comportamientos de riesgo del individuo para la adquisición de la infección por el VIH<sup>7,12</sup>. Esta medida fue evaluada a finales de la década de 1980 y principios de la de 1990 y se observó que, tras la inclusión de la entrevista personal, la tasa de donantes excluidos era mayor que si se utilizaba únicamente un cuestionario escrito<sup>13-16</sup>. Finalmente, los donantes están obligados a firmar un documento de consentimiento donde manifiestan estar en conocimiento de la imposibilidad de donar sangre si han mantenido conductas de riesgo para la infección por el VIH, y en caso de que resultaran seropositivos, entrar a formar parte de una lista de donantes excluidos de manera permanente<sup>7</sup>.

La exclusión confidencial de unidad de sangre (Confidential Unit Exclusion, CUE) es otra medida puesta en práctica en 1986, con el objetivo de facilitar un mecanismo por el cual puedan autoexcluirse de donar sangre los individuos que reconocen tener o haber tenido una conducta de riesgo o tienen conocimiento de infección por el VIH<sup>17</sup>. La CUE fue desarrollada debido a que, en ciertas circunstancias, un individuo puede sentirse socialmente obligado a donar sangre a pesar de saber que está o podría estar infectado por el VIH (p. ej., en EE.UU. se realizan campañas de donación masiva en centros de trabajo, centros de enseñanza, etc). De esta manera, en el cuestionario a llenar aparece una opción mediante la cual el posible donante sugiere confidencialmente que la unidad de sangre que está siendo donada sea desecharla directamente sin necesidad de que sea analizada en el laboratorio. Sin embargo, la CUE ha demostrado tener una baja sensibilidad y efectividad<sup>18</sup>, y por este motivo ha dejado de aplicarse en la mayoría de los bancos de sangre norteamericanos<sup>19</sup>.

El proceso de revisión de la historia de los donantes ofrece la oportunidad de evitar donaciones de sangre potencialmente infectada por el VIH u otros patógenos sanguíneos. Diferentes estudios han sugerido que el uso de este proceso de educación y cribado inicial de los donantes fue realmente efectivo en la reducción del riesgo asociado a la transmisión del VIH mediante la transfusión antes de la implantación de las pruebas de detección de anticuerpos anti-VIH en marzo de 1985<sup>5,8,9,20,21</sup>. De hecho, en el área de la Bahía de San Francisco, aproximadamente un 90% de los donantes con un alto factor de riesgo para la infección por el VIH (la mayoría varones homosexuales) fueron excluidos por decisión propia o por parte de los bancos de sangre antes de iniciar el estudio de anticuerpos anti-VIH<sup>5</sup>.

A pesar del éxito demostrado de la aplicación de métodos educativos y del cribado inicial relacionados con la infección por el VIH en donantes, hay que tener en cuenta que también estos métodos presentan claras limitaciones. En primer lugar, los donantes deben entender el material informativo que reciben y las preguntas planteadas por el personal sanitario. Éste es un punto muy importante a tener en cuenta en EE.UU., donde conviven distintas razas y culturas, que hablan diferentes lenguas<sup>22</sup>. Por otro lado, los donantes deben contestar sinceramente a las preguntas planteadas, lo cual no debe darse siempre por hecho, teniendo en cuenta que las principales rutas de transmisión del VIH incluyen conductas muy íntimas y personales, como prácticas sexuales concretas o el uso de drogas por vía intravenosa. Los donantes deben ser conscientes, si es su caso, de que mantienen un comportamiento de riesgo, situación que no siempre ocurre. Por ejemplo, hay individuos que, sin tener conocimiento de ello, han mantenido relaciones sexuales con personas que estaban infectadas por el VIH, o con riesgo elevado para la infección.

Los CDC en colaboración con los bancos de sangre, realizaron un estudio en el cual entrevistaron a donantes infectados por el VIH con la intención de mejorar los métodos iniciales de cribado y profundizar más en la epidemiología y las características de comportamiento de este grupo<sup>23</sup>. Este estudio demostró que una gran proporción de los donantes infectados era consciente de haber mantenido conductas de riesgo en el momento de la donación. Estos donantes expresaron que las principales motivaciones a la hora de donar sangre incluían el deseo de ser examinados frente al VIH, la presión social a ser juzgados por los demás, recibir una compensación o disponer de tiempo libre en el trabajo. Además, la falta de privacidad durante el proceso de donación fue un tema de preocupación en aproximadamente el 80% de los donantes.

Posteriormente, se realizó otro estudio sobre los comportamientos de riesgo en donantes de sangre, con el objetivo de estimar la prevalencia de conductas de riesgo no detectadas en personas que habían donado sangre durante los 2 meses previos al estudio. Utilizando una encuesta anónima por correo, se demostró que hasta un 1,9% de las personas que participaron declaró haber tenido una conducta de riesgo que podría estar relacionada con exposición al VIH, coincidente con el momento de la donación<sup>24</sup>.

Recientemente, la FDA y la Asociación de Bancos de Sangre Americanos han planteado la posibilidad de reevaluar el proceso de selección de los donantes de sangre en EE.UU., poniendo de manifiesto como principal tema de preocupación el elevado número y la complejidad de las preguntas que aparecen en los cuestionarios a los que son sometidos, además de la baja sensibilidad de dichas preguntas en la detección de donantes de alto riesgo.

### Pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH-1 y 2

El cribado de anticuerpos anti-VIH-1 de todas las donaciones de sangre fue implantado en EE.UU. en marzo de 1985<sup>8,9</sup>. El tipo de análisis más ampliamente utilizado para la detección de anticuerpos ha sido el enzimoinmunoanálisis (EIA o ELISA). Los primeros EIA que se diseñaron estaban basados en un lisado del VIH-1 completo (EIA de primera generación) y presentaban un período ventana medio de 45 días<sup>25,26</sup>. A partir de 1992, después de que la FDA aprobara EIA diseñados con antígenos recombinantes capaces de detectar anticuerpos frente al VIH-1 y el VIH-2 (EIA de tercera generación), todas las donaciones de sangre y

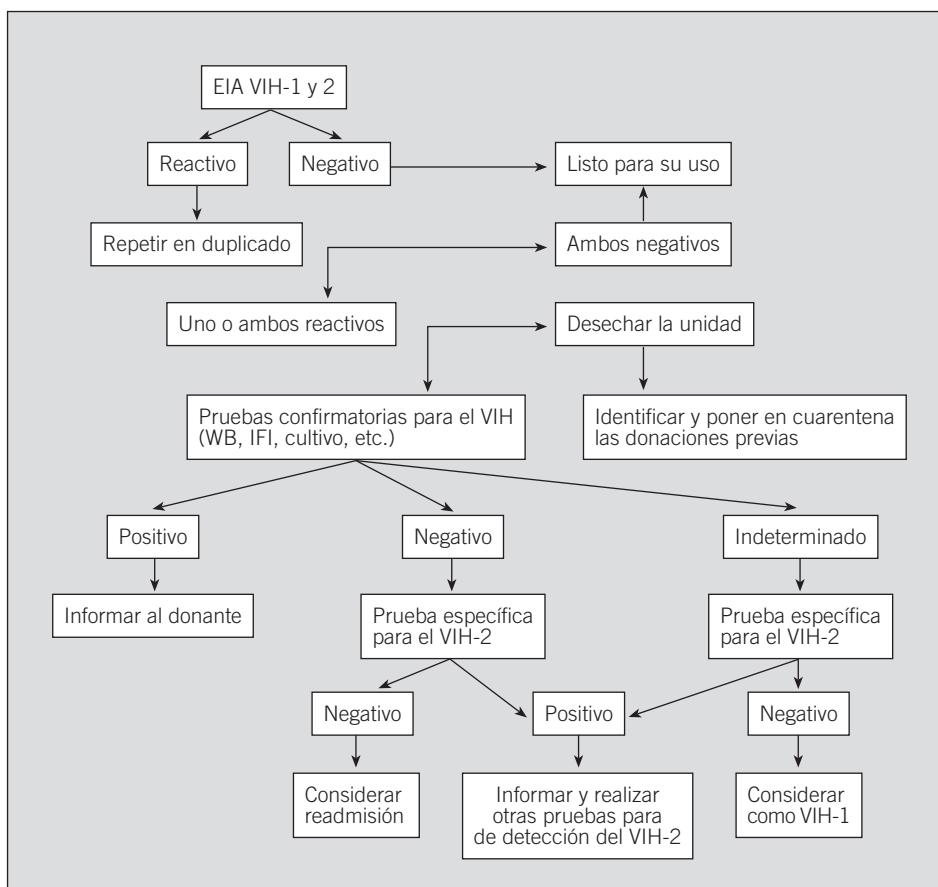


Fig. 1. Algoritmo diagnóstico para la infección por el VIH-1 y el VIH-2 en donantes de sangre en EE.UU. EIA: enzimoinmunoanálisis; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; WB: Western blot; IFI: inmunofluorescencia indirecta.

derivados sanguíneos fueron cribados también frente al VIH-2<sup>27</sup>. Actualmente, el período ventana medio de los EIA recombinantes más sensibles que contienen antígenos del VIH-1 y el VIH-2 ronda los 22 días<sup>26</sup>. En marzo de 1996, se implantó en EE.UU. el uso de métodos de detección de antígeno p24 en bancos de sangre<sup>25</sup>, lo cual redujo ligeramente el período ventana, detectando la infección aproximadamente 6 días antes que con las técnicas de detección de anticuerpos (tabla 1)<sup>26</sup>.

La figura 1 muestra el algoritmo diagnóstico para la infección por el VIH-1 y el VIH-2 en donantes de sangre en EE.UU. Paralelamente a este análisis, en la actualidad se aplican técnicas de detección de ácidos nucleicos (NAT), las cuales serán comentadas más adelante. En general, si alguna muestra resulta reactiva en la prueba de detección de anticuerpos, ésta debe ser repetida en la muestra original y en una muestra de plasma directamente recogida de la bolsa de sangre<sup>9</sup>. Si una o ambas muestras resultan reactivas, la unidad de sangre no puede ser transfundida ni utilizada para la elaboración de ningún tipo de derivado sanguíneo. En estos casos, se realiza una búsqueda retrospectiva de las donaciones previas del mismo individuo, las cuales son puestas en cuarentena con el objetivo de analizarlas y obtener resultados definitivos<sup>7</sup>. La FDA recomienda que toda donación repetidamente reactiva en las pruebas de detección de anticuerpos frente al VIH-1 y 2 debe ser analizada mediante pruebas suplementarias de confirmación antes de la notificación y el consejo a los individuos afectados<sup>7</sup>. Las pruebas confirmatorias tienen una especial importancia en los bancos de sangre, ya que la mayoría de los resultados reactivos iniciales en los EIA podrían ser debidos a fal-

sos positivos, dada la baja prevalencia de infección por el VIH en el colectivo de donantes en EE.UU.<sup>28,29</sup>. En un estudio realizado entre los años 1988 y 1998, donde se analizaron más de 25 millones de donaciones, se observó que la prevalencia de infección por el VIH en donantes de sangre disminuyó de un 0,023% a un 0,005% ( $p < 0,01$ )<sup>28-30</sup>. Sin embargo, al analizar la población general estadounidense, la tasa de infección se situaba en un rango 100 veces mayor<sup>28-30</sup>. Por tanto, aunque las pruebas suplementarias de confirmación deben gozar, en general, de una alta especificidad, esta característica es primordial en relación con su uso en bancos de sangre. La tabla 2 muestra las principales pruebas confirmatorias de la infección por el VIH, aunque el Western blot (WB) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI) son las más ampliamente utilizadas en los bancos de sangre norteamericanos<sup>8</sup>.

#### TABLA 1

#### Reducción del período ventana de la infección por el VIH obtenido con el avance tecnológico de los últimos años. Reducción del riesgo de transmisión por transfusión

Año	Técnica	Período ventana	Riesgo/millón unidades transfundidas
1985	EIA VIH (primera generación)	56 días	7,7
1992	EIA VIH (tercera generación)	22 días	1,8
1996	VIH-1 antígeno p24	16 días	1,3
1999	NAT en mini-pools	11 días	0,5

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; EIA: enzimoinmunoanálisis.

TABLA 2

**Pruebas suplementarias de confirmación de la infección por el VIH**

Western blot
IFI
RIPA
LIA y variantes (p. ej., RIBA, Ortho; Pepti-LAV, Pasteur; Matrix, Abbott; Innolia, Behring; etc.)

IFI: inmunofluorescencia indirecta; LIA: inmunoanálisis lineal; RIPA: análisis por radioinmunoprecipitación.

Los CDC y la Association of Public Health Laboratories, (APHL) han recomendado unos criterios específicos de uso e interpretación del WB<sup>31</sup>, utilizados aproximadamente por el 85% de los laboratorios norteamericanos<sup>32</sup>. Brevemente, recomiendan que la presencia de dos de las siguientes bandas, p24, gp41 y gp120/160, debe ser interpretada como un resultado positivo. La ausencia total de bandas es considerada resultado negativo, mientras que cualquier patrón de bandas que no cumpla los criterios de positividad mencionados anteriormente debe ser considerado como WB indeterminado<sup>31</sup>. Las personas que presentan un resultado indeterminado en el WB reciben información y consejo de cara a una posible infección por el VIH, comenzando un seguimiento que requiere, además, la investigación de infección por el VIH-2 y un nuevo control a los 30 días. En caso de que transcurrido este tiempo el resultado continuara siendo indeterminado y en ausencia de factores de riesgo o sintomatología clínica, la persona sería considerada negativa para el VIH-1<sup>33</sup>. Sin embargo, la persistencia de un resultado indeterminado para el VIH en el WB excluye directamente al individuo de ser donante de sangre<sup>7</sup>.

Desde que se adoptaron estos criterios de interpretación del WB, se han realizado estudios de seguimiento longitudinal en donantes con WB indeterminado<sup>34-36</sup>. Este tipo de estudios ha demostrado que existe una muy baja proporción de donantes infectados por el VIH con WB indeterminado. De hecho, la mayoría de los donantes que presentan un patrón indeterminado en el WB mantenido en el tiempo no presentan VIH detectable mediante técnicas de amplificación genética y de detección de antigenemia p24, después de un largo período de seguimiento<sup>34-36</sup>. La utilización de estos criterios propuestos por los CDC y la APHL ha dado lugar también a resultados de WB falsos positivos<sup>37</sup>. En este sentido, la implantación de técnicas de detección de ácidos nucleicos ha ayudado a solucionar este tipo de problemas diagnósticos.

En el caso de donantes con un EIA reactivo que presentan WB indeterminado/negativo se estudia más a fondo la posibilidad de una infección por el VIH-2, aplicando pruebas suplementarias específicas para este virus. Ciertos estudios epidemiológicos han demostrado que la prevalencia de infección por el VIH-2 en donantes de sangre de EE.UU. es muy baja. Además, durante el período comprendido entre 1992 y 1996 la Cruz Roja Americana analizó más de 28,5 millones de donaciones, y encontró únicamente un caso de infección confirmada por el VIH-2<sup>38</sup>. De hecho, hasta el momento no se ha descrito ningún caso de transmisión del VIH-2 por transfusión y sólo se han identificado tres casos de infección por VIH-2 en bancos de sangre<sup>38</sup>. Sin embargo, aunque la tasa de infección por el VIH-2 en donantes es casi nula, desde junio de 1992 la FDA recomienda el cribado obligatorio de anticuerpos frente al VIH-2<sup>7,27</sup>.

**Pruebas de detección de ácidos nucleicos**

A principios de 1999, se implantan en EE.UU. y Canadá los métodos de detección de ácidos nucleicos (*nucleic acid tes-*

*ting, NAT*) para el virus de la hepatitis C (VHC) y el VIH-1 en los bancos de sangre (bajo programas de investigación propuestos por la FDA), con el propósito de reducir al mínimo el período ventana de detección de la infección por ambos virus y evitar posibles transmisiones por parte de donantes que se encuentren en período de seroconversión<sup>39</sup>.

Sin embargo, una de las razones principales que impulsó el desarrollo y la implantación de los NAT en bancos de sangre de EE.UU. fue el requerimiento, a partir del 1 de julio de 1999, por parte de la Unión Europea, de que todo plasma introducido en Europa con fines comerciales debía estar analizado para la detección de ARN del VHC<sup>40,41</sup>. En 1994, muchos casos de infección por el VHC fueron atribuidos a la administración de Gammagard, una preparación de inmunoglobulina intravenosa comercializada por los laboratorios Baxter (Round Lake, IL), que no había sido sometida a inactivación viral. En respuesta a esto, el Center for Biologics Evaluation & Research (CBER) de EE.UU., perteneciente a la FDA, recomendó que toda preparación de inmunoglobulina inyectable que no fuera sometida a proceso de inactivación debía ser examinada para la detección de ARN del VHC por medio de NAT. De igual manera, el Instituto Paul Arlich en Alemania requirió que los plasmas que se utilizaran para la producción de inmunoglobulina intravenosa debían ser negativos para la presencia de ARN del VHC. Finalmente, el Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) europeo exigió a partir de julio de 1999 las mismas medidas para todos los productos obtenidos a partir de plasma, que fueran comercializados en la Comunidad Europea. En un principio, la Cruz Roja Americana y otros 4 bancos de sangre independientes comenzaron utilizando la técnica Procleix TMA HIV-1/HCV (Chiron Corp., Emeryville, CA) analizando una mezcla de plasmas de distintos individuos o *pools* de 128 muestras, tras la retirada previa de muestras con serología positiva. A finales de 1999, los *pools* son reducidos a 16 muestras (*mini-pools*) y analizados independientemente del resultado serológico. Paralelamente, la técnica COBAS AmpliScreen para el VHC y el VIH (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN) fue implantada en 13 bancos de sangre norteamericanos independientes, usando *pools* de 24 muestras<sup>42</sup>. Estos NAT presentan un límite de detección medido en copias de ARN por ml de plasma de alrededor de 80 para el VIH-1 y 190 para el VHC, y han demostrado ser capaces de detectar los actuales estándares de sensibilidad exigidos por la FDA, que se sitúan en 100 y 230 copias de ARN por ml de *pool* de plasmas para el VIH-1 y el VHC, respectivamente, o 5.000 copias por ml en unidad de sangre individual<sup>43</sup>.

El avance tecnológico y la mejora de los métodos diagnósticos durante los últimos 20 años han provocado un espectacular descenso del riesgo de adquirir una infección viral conocida a través de transfusión sanguínea. Este riesgo es debido principalmente a la existencia de cuatro hechos específicos (tabla 3):

1. Donaciones en preseroconversión (período ventana)
2. Generación de diferentes variantes virales no detectables por las técnicas actuales de diagnóstico.
3. Seroconversiones atípicas.
4. Errores humanos al realizar las pruebas de laboratorio.

La continua aparición de diferentes subtipos de VIH y VHC puede afectar a la sensibilidad de las técnicas de diagnóstico. Los NAT para la detección y la cuantificación del VIH están específicamente diseñados sobre la base de la secuencia genética del VIH-1 subtipo B, el encontrado con más frecuencia en los países desarrollados. Sin embargo, la

TABLA 3

**Riesgo estimado de infección viral por cada 10<sup>7</sup> donaciones analizadas**

Período ventana	Variantes genéticas	Seroconversión atípica	Error de laboratorio	Total
VIH	15 (93,7%)	< 0,6 (< 3,7%)	< 0,1 (< 0,6%)	0,4 (2,5%)
VHC	80 (72,1-87,9%)	< 1 (< 1,1- < 0,9%)	0-20 (0-21,9%)	11,2 (0-21,9%)
VHB	63-150 (41,2-98,0%)	< 0 (0%)	1 (0,6-1,5%)	1-3 (0,6-4,5%)
HTLV	15 (93,7%)	< 1 (< 6,2%)	1 (6,2%)	0,8 (5%)
Total	183-260 (61,8-96,8%)	< 1 (< 0,3- < 0,5%)	0-20 (0-10,6%)	15,4 (5,2-8,1%)
				189-296

prevalencia de subtipos no B del VIH-1 está aumentando en Europa y EE.UU. durante los últimos años<sup>44-54</sup>, y esto es un hecho a tener en cuenta en la aplicación de los NAT, puesto que estudios previos han demostrado la problemática que presentaban estas técnicas a la hora de detectar y cuantificar subtipos no B del VIH-1<sup>55</sup>. En este sentido, el desarrollo de nuevas versiones de estas técnicas tiene presente la variabilidad de estos virus y, de hecho, los NAT actualmente aprobados por la FDA para su uso en bancos de sangre han demostrado ser capaces de detectar todos los subtipos hasta el momento descritos del VIH-1 grupo M<sup>56,57</sup>. Por otro lado, las seroconversiones atípicas y los errores cometidos en el laboratorio al realizar las técnicas son muy poco frecuentes<sup>58,59</sup>. Realmente, estos últimos sólo llegan a ser significativos en el caso de que el error sea cometido con una muestra positiva. Teniendo en cuenta la baja tasa de error (aproximadamente del 0,1%) y la escasa prevalencia de infección en donantes de sangre, se estima que estos errores constituyen una pequeña fracción (5-10%) del riesgo total de infección por un determinado patógeno<sup>58</sup>.

Sin embargo, la posibilidad de donar sangre durante el período ventana representa la principal causa de riesgo de infección por el VIH y otras infecciones virales en bancos de sangre (tabla 3)<sup>59-61</sup>. El período de seroconversión en la infección por el VIH es aproximadamente de 40 días, aunque hay casos raros en los que la aparición de anticuerpos no se produce hasta incluso después de 6 meses de la infección<sup>62</sup>. En estos casos de período ventana prolongado, los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o detección de antígeno p24 no muestran un resultado positivo hasta unas pocas semanas anteriores a la aparición de

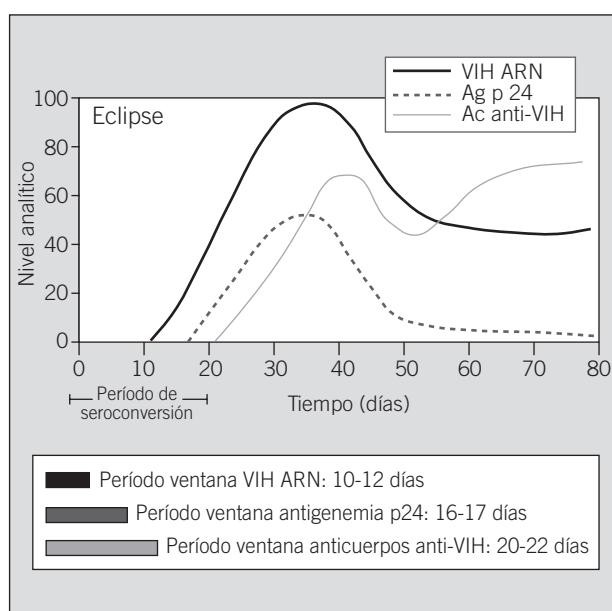
anticuerpos específicos frente al virus. Estas seroconversiones tan largas están ligadas a un retraso en la diseminación del virus, por lo que se estima que la infectividad durante este período podría ser muy baja. Hasta la implantación de las técnicas de detección de ácidos nucleicos en 1999, la FDA recomendó la detección de antigenemia p24 en todas las donaciones, dado que la infección es detectada una media de 6 días antes que con las técnicas de detección de anticuerpos (tabla 1).

En general, recogiendo datos derivados de diferentes estudios realizados que utilizan paneles de muestras de donantes en período de seroconversión en combinación con técnicas avanzadas de modelos estadísticos, se ha elaborado una imagen detallada de los marcadores y de la dinámica viral en los estadios tempranos de la infección por VIH-1 (fig. 2)<sup>41,43</sup>.

Actualmente, se ha prestado especial interés a la cuantificación de estos marcadores virales, con la intención de calcular el tiempo que tarda una persona en ser virémica (viremia detectable) después de la exposición, y el grado de viremia asociado a la transmisión por transfusión. Este período se denomina «fase eclipse» y, aunque generalmente dura unos 10 días, podría llegar a durar varios meses<sup>41</sup>. Parece que durante la fase eclipse el virus podría estar replicándose en tejido hepático o en tejido linfoide local correspondiente al lugar de inoculación, hasta que se disemina a la circulación sanguínea. Durante este período es materialmente imposible detectar la infección, aunque a veces aparecen pequeños valores de viremia que podrían ser detectados transitoriamente (*blips*)<sup>62</sup>. Mediante estudios de modelos de riesgo se presume que durante la fase eclipse podría existir infectividad. Actualmente se están realizando estudios con la intención de caracterizar y asociar la infectividad con una determinada carga viral en fases muy tempranas de la infección. Pasado este período, se produce una fase exponencial de replicación, donde la carga viral aumenta rápidamente y es fácilmente detectable, mientras que el antígeno p24 continúa indetectable. Esta fase de detección única de ARN se estima que puede durar entre 3 y 5 días. Seguidamente, aparece un período de unos 5 días en el que el ARN y el antígeno p24 son detectables, mientras que las técnicas de detección de anticuerpos continúan negativas.

La dinámica de replicación de la infección por el VIH-1 es un factor que favorece el uso de técnicas de detección de ácidos nucleicos. Durante la fase temprana de detección única de ARN, los valores del VIH en plasma varían de < 100 a aproximadamente 10<sup>5</sup> copias de ARN por ml. Analizando los distintos valores de ARN en estas fases tempranas, se ha estimado que el tiempo de duplicación del ARN del VIH-1 es aproximadamente de 21 h, llegando a producirse del orden de 10<sup>2-7</sup> partículas (detectables por NAT de manera muy uniforme) cuando aún el antígeno p24 es indetectable<sup>62</sup>.

El riesgo residual de infección por el VIH, basándose únicamente en el análisis de las donaciones con métodos sensibles de detección de anticuerpos, se situaba en 1/600.000 unidades<sup>61</sup>.



En los primeros 18 meses de implantación de los NAT en bancos de sangre bajo programas de investigación, se analizaron 16,3 y 12,6 millones de donaciones para la detección del VHC y el VIH, respectivamente, encontrándose 62 donaciones con resultados positivos en los NAT para el VHC (1/263.000) y 4 para el VIH (1/3.150.000), que en todos los casos presentaban serología negativa. Sin embargo, durante este período se desecharon un total de 965 donaciones (1/15.800) por mostrar un resultado positivo en los NAT, que no pudo ser confirmado con posterioridad<sup>42</sup>.

Recientemente, se ha realizado un estudio en donantes que acudieron a la Cruz Roja Americana durante los años 2000 y 2001, con el fin de conocer el riesgo residual de adquirir el VIH-1 a través de una transfusión sanguínea por parte de un donante que se encuentre en el período ventana. Este estudio indicó que los NAT realizados en *pools* de 16 o 24 muestras reducían el riesgo, anteriormente situado en un 0,068 (mediante serología y detección de antígeno p24), a un 0,047, situando el período ventana en aproximadamente 10-11 días (tabla 1). Este análisis se traduce en que el riesgo actual de transmisión de la infección por el VIH-1 por transfusión a partir de una única unidad de sangre se sitúa aproximadamente en una de cada dos millones de unidades<sup>29</sup>.

Sin embargo, la elevada sensibilidad de las técnicas de detección de anticuerpos y antigenemia p24 pone en entredicho el coste-efectividad de los NAT, a menos que estas técnicas de detección de ácidos nucleicos reemplazaran a las anteriores. En este sentido, es indiscutible que los NAT jamás podrán sustituir a las técnicas de detección de anticuerpos, dada la existencia de la fase crónica de latencia de la enfermedad, cuando muchos de los individuos infectados no presentan viremia detectable en plasma durante largos períodos.

A pesar de la implantación de los NAT para el cribado de las donaciones sanguíneas, se han descrito diversos casos de transmisión del VIH-1 a través de transfusión. En EE.UU., durante el último año se han descrito al menos dos casos de transmisión del VIH-1 a tres receptores de derivados sanguíneos en bancos de sangre<sup>63</sup>. En el primero, ocurrido en San Antonio (Texas), en el Centro de Sangre y Tejidos del Sur de Texas, la transmisión se produjo a partir de la donación de una unidad de células rojas a un único receptor, que resultó negativa al ser analizada mediante NAT aplicado bajo investigación en mini-*pool* de 24 muestras, al igual que por antigenemia p24 y pruebas de detección de anticuerpos<sup>64,65</sup>. Posteriormente, la muestra original fue analizada a distintas diluciones por diferentes métodos, aprobados y no aprobados por la FDA, y se llegó a la conclusión de que esta muestra podría haber sido detectada aplicando NAT de manera individual para cada unidad de sangre (la carga viral en esta unidad de sangre era de aproximadamente 150 copias de ARN por ml de plasma)<sup>64,65</sup>. En el segundo caso identificado en Florida, el VIH fue transmitido a dos receptores que recibieron plasma y células rojas provenientes de una unidad de sangre que resultó negativa al ser analizada por un NAT en mini-*pool* de 16 muestras, antigenemia p24 y en las pruebas de detección de anticuerpos<sup>63</sup>.

En este caso, no se conserva muestra original para poder cuantificar la carga viral del VIH en el momento de la transmisión, y por tanto tener la posibilidad de hacer estudios de sensibilidad de las técnicas a distintas diluciones. La existencia de estos dos casos de transmisión pone de manifiesto que aunque el riesgo residual de transmisión del VIH en bancos de sangre es muy bajo, éste existe incluso tras la implantación de técnicas sensibles de detección de ácidos nucleicos, las cuales reducen el riesgo a una de

cada dos millones de donaciones y el período ventana a aproximadamente 11 días. Aunque los NAT presentan un grado de sensibilidad muy alto, técnicamente son complejos, laboriosos y requieren un tiempo de realización considerable, además de personal muy bien entrenado. Por este motivo, se planteó en un principio hacer mini-*pools* de 16 o 24 muestras hasta que se desarrollaran NAT con las mejoras y la automatización necesarias para procesar las muestras individualmente, manteniendo una eficacia similar. En este sentido, la automatización del proceso es un punto crítico a la hora de procesar un gran volumen de muestras en cortos períodos, lo cual es necesario teniendo en cuenta que en los EE.UU. se reciben más de 14 millones de donaciones al año<sup>66</sup>.

Basándonos en el análisis global de los primeros 4 años de experiencia en el uso de NAT para el VIH-1 y el VHC en bancos de sangre de EE.UU., se plantea la posibilidad y el deseo de su implantación en bancos de sangre europeos, dado su claro avance en la reducción del período ventana de detección de dichas infecciones en sangre, con respecto al uso aislado de métodos serológicos.

## El futuro de los NAT

### Análisis individual de muestras por NAT

El paso del análisis en mini-*pools* al procesamiento individual de muestras aumentaría la sensibilidad de los NAT en el cribado de donaciones de sangre. De hecho, en 1999 se iniciaron estudios clínicos para la evaluación de los NAT en donaciones de sangre completa, de manera individual y en mini-*pools*, estimando que el procesamiento de las muestras de manera individual reduciría el riesgo de transmisión del VIH a uno de cada tres millones de donaciones, y el período ventana de detección de la infección quedaría reducido a 7 días<sup>67,68</sup>. La posibilidad de la implantación de esta medida en los bancos de sangre de EE.UU. fue un tema muy discutido en una reunión del Blood Product Advisory Committee (BPAC), celebrada en septiembre de 2002. En esta reunión se comentó que, aunque es posible realizar NAT individualizados, se necesita un gran avance técnico que haga viable y eficiente su implantación en el ámbito de los bancos de sangre. El rendimiento estimado de la reducción en 4 días del período ventana aplicando NAT individualizados daría lugar a la detección de una media de tres casos adicionales de infección por el VIH en donantes al año. Sin embargo, este rendimiento no estaría justificado por el alto coste que generaría el proceso (alrededor de 2,7 millones de dólares por caso detectado)<sup>69,70</sup>. Finalmente, se puso especial énfasis en que, incluso si se supera las dificultades técnicas y económicas, se implantan los NAT de manera individual para cada donación, seguiría existiendo un período ventana en el cual la infección no podría ser detectada (alrededor de 7 días) y, por tanto, un riesgo residual de infección.

### Procesos de inactivación de patógenos en sangre

Hasta el momento no se han desarrollado métodos que inactiven virus en sangre completa sin que se produzca daño celular. En el caso del VIH, esto es aún más complicado, dado que el virus es capaz de introducir su material genético en el propio genoma de la célula que infecta, en forma de provirus. Otra complicación añadida es que el provirus es capaz de permanecer integrado en la célula de manera silente durante largos períodos. Además, hasta el momento no se ha descrito ningún marcador celular que haga posible distinguir células infectadas de células sanas.

No obstante, actualmente existen métodos muy efectivos de inactivación viral en plasma y derivados plasmáticos<sup>71</sup>. Sin embargo, a pesar de que estos métodos han sido aprobados e implantados en bancos de sangre, los NAT han sido igualmente recomendados para el análisis de plasma y derivados. En general, parece ser que esta medida fue adoptada con el fin de asegurar la efectividad del proceso de inactivación viral.

#### Innovaciones técnicas: microarrays

La tecnología de los *microarrays* o *chips* permite el análisis de diferentes genes de manera simultánea, hecho que contribuiría positivamente al aumento de la eficacia de los métodos de cribado en los bancos de sangre y, por tanto, garantizar la seguridad transfusional. Actualmente, las técnicas de *microarray* sólo están al alcance de laboratorios de investigación, y se estima que al menos hasta dentro de 5-10 años no estarán disponibles para el cribado y el análisis de sangre sistemáticos en laboratorios. Sin embargo, esta tecnología va avanzando y mejora de manera muy rápida, y existe la posibilidad de que en un futuro cercano dispongamos de técnicas rápidas y de bajo coste para cribar las donaciones de sangre frente a numerosos patógenos simultáneamente.

#### Conclusión

El elevado nivel de seguridad transfusional alcanzado en EE.UU. y el resto de los países desarrollados de todo el mundo es el reflejo del gran esfuerzo realizado durante los últimos 20 años para mejorar y refinar los métodos de cribado inicial de los donantes y las técnicas de detección e inactivación de los agentes infecciosos en las unidades sanguíneas. Gran parte de este progreso ha sido motivado y dirigido por el enorme impacto que representó la aparición de la epidemia del VIH en los receptores de sangre y derivados sanguíneos, a principios de los años ochenta. La reciente implantación de métodos de detección de ácidos nucleicos para el VIH y el VHC en bancos de sangre de EE.UU. ha supuesto uno de los avances tecnológicos más importantes en el cribado de las donaciones sanguíneas. Estos métodos han demostrado una mayor eficacia a la hora de detectar la infección temprana por el VIH con respecto a las técnicas serológicas (una media de 5 días antes que las pruebas de detección de antígeno), situando el período ventana de la infección en 10-11 días. De hecho, la implantación del uso de los NAT en el cribado de donaciones ha reducido considerablemente el riesgo de transmisión del VIH a través de transfusiones (una de cada 2 millones de donaciones). Sin embargo, los recientes casos aislados de transmisión del VIH-1 en receptores sanguíneos en EE.UU. ponen de manifiesto la existencia de un riesgo residual actualmente infranqueable con los medios disponibles.

La posibilidad de disponer de técnicas y medidas cada vez más avanzadas que mejoren la calidad y la seguridad de las transfusiones sanguíneas es primordial en el ámbito sanitario de cualquier país del mundo. En este sentido, es necesario mantener un desarrollo y avance científico-tecnológico continuos que nos permitan conservar y optimizar en el tiempo el elevado nivel de seguridad transfusional alcanzado actualmente.

#### Agradecimientos

A la Dra. Beatriz Hernández (Bethesda) y al Dr. Vicente Soriano (Madrid) por la revisión crítica del texto original.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Dodd RY. Germs, gels, and genomes: A personal recollection of 30 years in blood safety testing. En: Stramer SL, editor. Blood safety in the new millennium. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2001; p. 97-122.
- Busch MP. Residual risk of viral infections by transfusions and projected yields of additional screening test. Retroviral Epidemiology Donors Study (REDS). Transfus Clin Biol 1996;1:7-11.
- Centers for Disease Control and Prevention. HIV/AIDS Surveillance Report, 1999;11:1-45.
- Kroner B, Rosenberg P, Aledort L, Alvord W, Goedert J. HIV-1 infection incidence among persons with hemophilia in the United States and western Europe, 1978-1990. Multicenter Hemophilia Cohort Study. J Acquir Immune Defic Syndr 1994;7:279-86.
- Busch M, Young M, Samson S, Mosley J, Ward J, Perkins H. Risk of HIV transmission by blood transfusion before the implementation of HIV-1 antibody screening. Transfusion 1991;31:4-11.
- Food and Drug Administration. Memorandum, March 1983: recommendations to decrease the risk of transmitting acquired immune deficiency syndrome (AIDS) from blood donors. Bethesda: US Department of Health and Human Services, FDA, 1983.
- Food and Drug Administration Memorandum, April 23, 1992: revised recommendations for the prevention of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by blood and blood products. Bethesda: US Department of Health and Human Services, FDA, 1992.
- American Association of Blood Banks. Technical Manual. 13th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1999.
- Busch M. HIV testing in blood banks. En: Schonetman G, George J, editors. AIDS testing. 2nd ed. New York: Springer-Verlag, 1994; p.224-36.
- Committee to Study HIV Transmission Through Blood and Blood Products/Institute of Medicine. The US Blood Supply system. En: Leveton L, Sox J, Stoto M, editors. HIV and the blood supply: an analysis of critical decision making. Washington, DC: National Academy Press, 1995; p. 25-55.
- Alter H, Holland P, Purcell RH, Lander JJ, Feinstone SM, Morrow AG, et al. Post transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen-positive donors. Ann Intern Med 1972;77:691-9.
- Food and Drug Administration. Memorandum, December 5, 1990: revised recommendations for the prevention of HIV transmission by blood and blood products. Bethesda, MD: US Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, 1990.
- Johnson ES, Doll LS, Satten GA, Leney B, Shafer AW, Kamel H, et al. Direct oral questions to blood donors: the impact on screening for human immunodeficiency virus. Transfusion 1994;34:769-74.
- Mayo DJ, Rose AM, Matchett SE, Hoppe PA, Solomon JM, McCurdy KK. Screening potential blood donors at risk for human immunodeficiency virus. Transfusion 1991;31:466-74.
- Silvergleid A, Leparc G, Schmidt P. Impact of explicit questions about high-risk activities on donor attitude and donor deferral patterns. Results in two community blood centers. Transfusion 1989;29:362-4.
- Gimble J, Friedman L. Effects of oral donor questioning about high-risk behaviors for human immunodeficiency virus infection. Transfusion 1992;32:446-9.
- Food and Drug Administration. Memorandum, October 30, 1986: additional recommendations for reducing further the number of units of blood and plasma donated for transfusion or for further manufacture by persons at increased risk of HTLV-II/LAV infection. Bethesda: US Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, 1986.
- Petersen LR, Lackritz E, Lewis WF, Smith DS, Herrera G, Raimondi V, et al. The effectiveness of the confidential unit exclusion option. Transfusion 1994;34:865-9.
- America's Blood Centers. Status of Confidential Unit Exclusion (CUE), America's Blood Centers survey, November 1999 (No. 2). ABC Newsletter 2000; p. 5.
- Pinsky J, Waldman A, Zang E, Oleszko W, Lowy M, Bianco C. Measures to decrease the risk of acquired immunodeficiency syndrome transmission by blood transfusion. Evidence of volunteer blood donor cooperation. Transfusion 1985;25:3-9.
- Seage GR 3rd, Barry MA, Landers S, Silvia AM, Lamb GA. Patterns of blood donations among individuals at risk for AIDS, 1984. Am J Public Health 1988;78:576-7.
- Doll LS, Petersen LR, White CR, Ward JW. Human immunodeficiency virus type 1-infected blood donors: behavioral characteristics and reasons for donation. The HIV Blood Donor Study Group. Transfusion 1991;31:704-9.
- Petersen LR, Doll LS. Human immunodeficiency virus type 1-infected blood donors: epidemiologic, laboratory, and donation characteristics. The HIV Blood Donor Study Group. Transfusion 1991;31:698-703.
- Williams AE, Thomson RA, Schreiber GB, Watanabe K, Bethel J, Lo A, et al. Estimates of infectious disease risk factors in US blood donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study. JAMA 1997;277:967-72.
- Centers for Disease Control and Prevention. US Public Health Service guidelines for testing and counseling blood and plasma donors for human immunodeficiency virus type 1 antigen. MMWR Recomm Rep 1996;45:1-9.

26. Busch MP, Lee LL, Satten GA, Henrard DR, Farzadegan H, Nelson KE, et al. Time course of detection of viral and serologic markers preceding human immunodeficiency virus type 1 seroconversion: implications for screening of blood and tissue donors. *Transfusion* 1995;35:91-7.
27. Centers for Disease Control and Prevention. Testing for antibodies to human immunodeficiency virus type 2 in the United States. *MMWR Recomm Rep* 1992;41:1-9.
28. Vu MQ, Steketee RW, Valleroy L, Weinstock H, Karon J, Janssen R. HIV incidence in the United States, 1978-1999. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;31:188-201.
29. Dodd RY, Notari EP 4th, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002;42:975-9.
30. Clark K, Finlayson T, Lavinghouse R, Busch M, Steketee R, Williams A. Prevalence rates and risk behaviors among U.S HIV positive blood donors [abstract ThOrC673]. XIII International AIDS Conference, Durban, 2000.
31. Centers for Disease Control. Interpretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR Recomm Rep* 1989;38(Suppl 7):1-7.
32. Centers for Disease Control and Prevention. Results of the 1999 retroviral testing survey questionnaire sent to laboratories participating in the model performance evaluation program. Atlanta: US Department of Health and Human Services, CDC, 1999.
33. Centers for Disease Control and Prevention. HIV counseling, testing, and referral, draft guidelines [notice]. *Federal Register* 2000;65:65241-2.
34. Busch MP, Kleinman SH, Williams AE, Smith JW, Ownby HE, Laycock ME, et al. Frequency of human immunodeficiency virus (HIV) infection among contemporary anti-HIV-1 and anti-HIV-1/2 supplemental test-indeterminate blood donors. *The Retrovirus Epidemiology Donor Study*. *Transfusion* 1996;36:37-44.
35. Migali E, Mariotti D, Lovari A, Tenani T, Imperiali P, Ozzola G. HIV-1: absence of infection in subjects with indeterminate western blot. *Allergol Immunopathol* 1993;21:61-5.
36. Jackson JB, Hanson MR, Johnson GM, Spahlinger TG, Polesky HF, Bowman RJ. Long-term follow-up of blood donors with indeterminate human immunodeficiency virus type 1 result on Western blot. *Transfusion* 1995;35:98-102.
37. Kleinman S, Busch MP, Hall L, Thomson R, Glynn S, Gallahan D, et al. False-positive HIV-1 test results in a low-risk screening setting of voluntary blood donation. *Retrovirus Epidemiology Donor Study*. *JAMA* 1998;280:1080-5.
38. Sullivan MT, Guido EA, Mettler RP, Schable CA, Williams AE, Stramer SL. Identification and characterization of an HIV-2 antibody-positive blood donor in the United States. *Transfusion* 1998;38:189-93.
39. Ling AE, Robbins KE, Brown TM, Dunmire V, Thoe SY, Wong SY, et al. Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with pre-seroconversion blood components during the infectious window period. *JAMA* 2000;284:210-4.
40. Flanagan P, Barbara J. PCR testing of plasma pools: From concept to reality. *Transfus Med Rev* 1999;13:164-76.
41. Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, Stramer SL, Hewlett I, Preston S. Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000;40:143-59.
42. Stramer SL, Caglioti S, Strang DM. NAT of the United States and Canadian blood supply. *Transfusion* 2000;40:1165-8.
43. Busch MP. HIV, HBV and HCV. New development related to transfusion safety. *Vox Sang* 2000;78:253-6.
44. Brodine SK, Mascolla JR, Weiss PJ, Ito SI, Porter KR, Artenstein AW, et al. Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in the USA. *Lancet* 1995;346:1198-9.
45. Weidle PJ, Ganea CE, Irwin KL. Presence of human immunodeficiency virus (HIV) type 1, group M, non-B subtypes, Bronx, New York: a sentinel site for monitoring HIV genetic diversity in the United States. *J Infect Dis* 2000;181:470-5.
46. Alaeus A, Leitner T, Lidman K, Albert J. Most HIV-1 genetic subtypes have entered Sweden. *AIDS* 1997;11:199-202.
47. Arnold C, Barlow KL, Parry JV, Clewley JP. At least five HIV-1 sequence subtypes (A, B, C, D, A/E) occur in England. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:427-9.
48. Barin F, Courouze AM, Pillonel J, Buzelay L. Increasing diversity of HIV-1M serotypes in French blood donors over a 10-year period (1985-1995). *Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion*. *AIDS* 1997;11:1503-8.
49. Boni J, Pyra H, Gebhardt M, Perrin L, Burgisser P, Matter L, et al. High frequency of non-B subtypes in newly diagnosed HIV-1 infections in Switzerland. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999;22:174-9.
50. Clewley JP, Arnold C, Barlow KL, Grant PR, Parry JV. Diverse HIV-1 genetic subtypes in UK. *Lancet* 1996;347:1487.
51. Couturier E, Damond F, Roques P, Fleury H, Barin F, Brunet JB, et al. HIV-1 diversity in France, 1996-1998. The AC 11 laboratory network. *AIDS* 2000;14:289-96.
52. Dietrich U, Ruppach H, Gehring S, Knechten H, Knickmann M, Jager H, et al. Large proportion of non-B HIV-1 subtypes and presence of zidovudine resistance mutations among German seroconvertors. *AIDS* 1997;11:1532-3.
53. Fransen K, Buve A, Nkengasong JN, Laga M, Van der Groen G. Long-standing presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet* 1996;347:1403.
54. Holguin A, Rodes B, Soriano V. Recombinant human immunodeficiency viruses type 1 circulating in Spain. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:505-11.
55. Alaeus A, Lidman K, Sonnerborg A, Albert J. Subtype-specific problems with quantification of plasma HIV-1RNA. *AIDS* 1997;11:859-65.
56. CBER/FDA web page <http://www.fda.gov/cber>.
57. Elbeik T, Alvord WG, Trichavaroj R, De Souza M, Dewar R, Brown A, et al. Comparative analysis of HIV-1 viral load assays on subtype quantification: Bayer Versant HIV-1 RNA 3.0 versus Roche Amplicor HIV-1 Monitor version 1.5. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2002;29:330-9.
58. Busch MP, Watanabe KK, Smith JW, Hermansen SW, Thomson RA. False-negative testing errors in routine viral marker screening of blood donors. For the Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion* 2000;40:585-9.
59. Busch MP, Stramer SL, Kleinman SH. Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. En: Garratty G, editor. *Applications of molecular biology to blood transfusion medicine*. Bethesda: American Association of Blood Banks, 1997; p. 123-76.
60. Lackritz EM, Satten GA, Aberle-Grasse J, Dodd RY, Raimondi VP, Janssen RS, et al. Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl J Med* 1995;333:1721-5.
61. Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. *The Retrovirus Epidemiology Donor Study*. *N Engl J Med* 1996;334:1685-90.
62. Busch MP, Satten GA. Time course of viremia and antibody seroconversion following human immunodeficiency virus exposure. *Am J Med* 1997;102:117-24.
63. America's Blood Centers. Two transfusion recipients infected with HIV by donor in HIV «window». *ABC Newsletter* 2002; 3-4.
64. Delwart E, Kalmin N, Jones S, Ladd D, Tobler L, Tsui R, et al. First case of HIV transmission by an RNA-screened blood donation [abstract 768-W]. 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Seattle 2002.
65. Busch MP, Kleinman SH, Nemo GJ. Current and emerging infectious risk of blood transfusions. *JAMA* 2003;289:959-62.
66. Gallarda JL, Dragon E. Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges. *Mol Diagnost* 2000;5:11-22.
67. Tabor E, Yu MY, Hewlett I, Epstein JS. Summary of a workshop on the implementation of NAT to screen donors of blood and plasma for viruses. *Transfusion* 2000;40:1273-5.
68. Legler TJ, Riggert J, Simson G, Wolf C, Humpe A, Munzel U, et al. Testing of individual blood donations for HCV RNA reduces the residual risk of transfusion-transmitted HCV infection. *Transfusion* 2000;40:1192-7.
69. Busch M and Dodd R. NAT and blood safety: what is the paradigm? *Transfusion* 2000;40:1157-60.
70. Busch M. Closing the windows on viral or viral transmission by blood transfusion. *Emily Cooley Lectures*. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2001.
71. Tabor E. The epidemiology of virus transmission by plasma derivatives: clinical studies verifying the lack of transmission of hepatitis B and C viruses and HIV type 1. *Transfusion* 1999;39:1160-8.