

Evaluación de la técnica Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA (BioRad) en un hospital general

Juan C. Alados-Arboledas, Luis Calbo-Torrecillas, M.^a Dolores López-Prieto, José Luis de Francisco-Ramírez y Constantino de Miguel-Sastre

Servicio de Microbiología. Hospital del SAS de Jerez de la Frontera. Cádiz. España.

INTRODUCCIÓN. Se evaluó una nueva técnica para la determinación simultánea de anticuerpos y antígeno del virus de la hepatitis C (VHC) (Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA; BioRad, Marnes la Coquette, France).

MÉTODOS. Se estudiaron dos grupos de población y 7 paneles (75 muestras) de seroconversión. Grupo 1: 1.360 sueros con solicitud de determinación de anticuerpos VHC. Grupo 2: 333 sueros de 183 pacientes hemodializados. Las muestras se ensayaron con la técnica Ortho HCV 3.0 (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, UK) y la técnica Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA.

RESULTADOS. Grupo 1: en los 1.360 sueros, se obtuvo resultado positivo en 74 casos con la técnica de rutina y en 77 casos con la técnica Monolisa. En 1.353 muestras coincidieron los resultados, 1.281 (-) y 72 (+). Cinco muestras fueron positivas sólo por Monolisa y 2 sólo por Ortho (concordancia global: 99,5%). Grupo 2: 325 muestras dieron resultados coincidentes, 308 (-) y 17 (+). Siete muestras dieron resultado positivo por Monolisa y negativo por Ortho. La sensibilidad de la técnica Monolisa en pacientes hemodializados fue claramente superior a la técnica Ortho (100 y 70,8%, respectivamente). Frente a los paneles de seroconversión la técnica Monolisa detectó 43 muestras positivas frente a las 18 de la técnica de anticuerpos consiguiendo una reducción del período ventana de hasta 72 días.

CONCLUSIONES. La técnica Monolisa presentó una elevada concordancia respecto a la técnica Ortho en la población general. En pacientes hemodializados se mostró más sensible que nuestra técnica de rutina. Por otro lado, el período ventana se redujo significativamente.

Palabras clave: Anticuerpos. Antígeno. Virus de la hepatitis C. Diagnóstico.

Clinical assessment of Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA (Bio-Rad) in a general hospital

INTRODUCTION. To evaluate a new test based on simultaneous detection of HCV antibodies and antigen (Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA; Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Correspondencia: Dr. J.C. Alados-Arboledas.
Servicio de Microbiología. Hospital del SAS de Jerez de la Frontera.
Ctra. Circunvalación, s/n. 11407 Jerez de la Frontera. Cádiz. España.
Correo electrónico: juanc.alados.sspa@juntadeandalucia.es

Manuscrito recibido el 2-5-2006; aceptado el 28-8-2006.

METHODS. We studied samples from two groups of patients and 7 commercial HCV seroconversion panels (75 samples). Group 1: 1360 serum samples from patients referred for routine testing of anti HCV antibodies. Group 2: 333 serum samples from 183 hemodialysis patients. All samples were tested by the Ortho HCV 3.0 technique (Ortho-Clinical Diagnostics, Amersham, UK) and the Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA technique.

RESULTS. Group 1: Seventy-four of 1360 serum samples were positive by Ortho HCV and 77 by Monolisa. In 1353 samples, the results with the two tests were concordant: 1281 negative and 72 positive. Five samples were positive only by Monolisa and 2 only by Ortho (overall agreement: 99.5%). Group 2: Results were concordant in 325 samples, 308 negative and 17 positive. Seven samples were positive by Monolisa and negative by Ortho. The sensitivity of the Monolisa test in hemodialysis patients was clearly higher than that of the Ortho test (100% and 70.8%, respectively). Monolisa detected HCV infection in 43 of 75 samples from the seroconversion panels; only 18 positive samples were detected by Ortho HCV. Monolisa reduced the window period by up to 72 days.

CONCLUSIONS. Our data indicate high agreement between the Monolisa and Ortho tests in samples from the general population. In hemodialysis patients, however, Monolisa was more sensitive. In addition, the Monolisa test significantly reduced the window period of HCV infection.

Key words: Antibodies. Antigen. Hepatitis C virus. Diagnostic.

Introducción

Desde finales de los años 1980, la introducción y posterior perfeccionamiento de los tests para la detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (VHC), ha permitido reducir enormemente el riesgo de transmisión de este virus¹⁻³. Las técnicas de biología molecular han logrado reducir el tiempo necesario para la detección de la infección hasta 1-2 semanas^{4,5}. Otra alternativa para el diagnóstico precoz de la infección por VHC es la determinación de antígeno del *core* VHC, que según algunos autores⁶⁻⁸ ofrece resultados similares a las técnicas de biología molecular, con la ventaja de utilizar una tecnología menos compleja. Recientemente ha aparecido en el mercado una prueba para la determinación simultánea de

anticuerpos y antígenos frente al VHC (Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA; BioRad, Marnes la Coquette, France) con la que potencialmente se reduce el período ventana⁸⁻¹¹. Esta prueba al desarrollarse bajo un formato de análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) y no precisar la manipulación previa de la muestra, es de fácil adaptación para cualquier laboratorio diagnóstico^{8,10}.

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar la técnica Monolisa HCV Ag/Ab ULTRA y compararla con nuestra técnica de rutina (Ortho HCV 3.0 SAvE test system, Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, UK). Para ello han sido estudiados dos grupos de pacientes, población general para escrutinio rutinario de VHC y seguimiento de pacientes hemodializados. Para evaluar la sensibilidad en la detección del VHC en las fases tempranas de la infección, se utilizaron paneles comerciales de seroconversión adecuadamente caracterizados por los fabricantes.

Material y métodos

Grupo 1. Población general

Se estudiaron 1.360 sueros de pacientes a los que se les solicitaba determinación de anticuerpos frente al VHC que correspondían a muestras llegadas a nuestro laboratorio durante el primer semestre de 2005 procedentes de atención primaria y hospital, excluyendo aquellas remitidas desde Nefrología, Digestivo e Infecciosos.

Grupo 2. Pacientes hemodializados

Se estudiaron 333 muestras correspondientes a 183 pacientes en programa de hemodiálisis. Se analizaron entre 1 y 4 muestras por paciente. Dieciséis de los pacientes estaban catalogados como VHC positivos, es decir, tenían infección pasada (AcVHC) o actual (AcVHC + ARN VHC) por VHC.

Paneles de seroconversión

Se analizaron 75 muestras secuenciales de 7 paneles comerciales: cinco provenían de Bioclinical Partner (Franklin, MA; BCP 6213, BCP 6222, BCP 6225, BCP 9041, BCP 9055) y dos de Boston Biomédica Inc. (West Bridgewater, MA; BBI 917, BBI 919). Los paneles contenían entre 7 y 19 muestras. La carga viral, genotipo y resultados de detección de anticuerpos por distintos ensayos comercializados fueron aportados por los fabricantes. A la recepción de estas muestras se alícuotaron en volúmenes de 300-330 µl y fueron congeladas a -80 °C hasta su uso.

Métodos

Todas las muestras del grupo 1 se procesaron simultáneamente por Ortho HCV 3.0 test system Enhanced SAvE (Ortho Clinical Diagnostics, Amersham, UK) para la determinación de anticuerpos y por Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA (BioRad, Marnes la Coquette, France) para la determinación simultánea de antígeno y anticuerpos. Los sueros con resultados discrepantes frente a las dos técnicas anteriores se ensayaron con una tercera técnica HCV Abbott AXYM System 3.0 (Abbott, Wiesbaden, Germany). Todas las muestras de los pacientes hemodializados (grupo 2) se estudiaron con las tres técnicas anteriores. Se utilizó la técnica Inno-LIA HCV Score (Innogenetics, Ghent, Belgium) como test confirmatorio en las muestras discrepantes. La determinación de ARN-VHC se realizó mediante Roche Amplicor HCV test, versión 2.0 (Roche Molecular Diagnostic Systems). Para la valoración de resultados serológicos y establecimiento de los resultados de referencia en los pacientes hemodializados nos ayudamos de la historia clínica. Los paneles de seroconversión se ensayaron únicamente por las dos técnicas iniciales (Ortho HCV 3.0 y Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA). En todos los casos los tests se realizaron siguiendo las indicaciones del fabricante.

El test Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA se basa en la combinación de un test indirecto de determinación de anticuerpos y un "sándwich" para la determinación de antígeno. En resumen, la técnica consta de los siguientes pasos: 50 µl de cada muestra o control se incuban a 37 °C durante 90 min con 100 µl de conjugado 1 (conteniendo anticuerpos monoclonales biotinilados anti-*core* VHC) en pocillos microtiter que contienen en su pared anticuerpos monoclonales frente a proteínas *core* VHC, proteínas recombinantes NS3 y NS4, y un péptido mutado antígeno-específico del *core* VHC. Después de un ciclo de lavados se adicionan 100 µl de conjugado 2 (conteniendo anti-IgG humana marcada con peroxidasa y estreptavidina-peroxidasa) a cada pocillo y se procede a incubación 37 °C 30 min. Después de un segundo ciclo de lavados, el complejo antígeno-anticuerpo se revela por la adición de sustrato; la reacción es parada a los 30 min de incubación a temperatura ambiente mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 N. La absorbancia es medida a 450 nm (filtro referencia a 620 nm). Las muestras son consideradas positivas si su densidad óptica es superior o igual al valor de corte (determinado dividiendo entre 4 la densidad óptica media de los controles positivos).

Resultados

Grupo 1. Población general

En 1.353 de los 1.360 sueros estudiados (99,5%) hubo concordancia en los resultados obtenidos por la técnica Ortho HCV y la de detección simultánea de Ag/Ac Monolisa (1.281 negativos y 72 positivos). En 7 muestras los resultados fueron discrepantes, 5 positivos sólo por Monolisa HCV y 2 positivos sólo por Ortho HCV. Estas muestras fueron estudiadas mediante el test HCV Abbott AXYM, mostrando resultado positivo 2 de las 5 muestras positivas por Monolisa y 1 de las 2 muestras positivas por Ortho HCV. De estas últimas, la que dio resultado positivo mediante la técnica de Abbott, aunque presentó un resultado negativo por el test Monolisa, su absorbancia fue cercana al *cutoff* (índice s/co 0,74).

Grupo 2. Pacientes hemodializados

La correlación de las dos técnicas (Monolisa HCV y Ortho HCV) fue del 97,6% (308 negativos y 17 positivos de 333 muestras estudiadas). En 8 muestras correspondientes a 8 pacientes, encontramos resultados discrepantes (7 positivos sólo por Monolisa y 1 positivo sólo por Ortho HCV). La tabla 1 muestra los resultados de las 8 muestras discrepantes. La única muestra positiva por Ortho HCV y negativa por Monolisa, no se confirmó por ninguno de los demás test utilizados (HCV Abbott, Inno-LIA, PCR-VHC) por lo que se consideró como negativa (falso positivo por Ortho HCV). Cinco de los 7 positivos por Monolisa también lo fueron por HCV Abbott y test confirmatorio Inno-LIA, por lo que se consideraron verdaderos positivos. La muestra FTR correspondía al seguimiento de un paciente, en el que los resultados mediante HCV Abbott también fueron positivos, aunque cerca del *cutoff*. Este paciente según su historia clínica era AcVHC(+) antes de entrar en programa de hemodiálisis. Se realizó el test confirmatorio Inno-LIA, presentando un patrón indeterminado con anticuerpos frente a *core*, patrón que sería compatible con una infección pasada resuelta con anticuerpos residuales, por lo que para el análisis de sensibilidad y especificidad se consideró verdadero positivo. De forma análoga, el paciente CCL mostrando resultado negativo por la técnica de Ortho HCV, positivo por Monolisa y HCV Abbott y un patrón indeterminado (*core*) mediante Inno-LIA se conside-

TABLA 1. Análisis de los pacientes hemodializados con resultados discrepantes

Paciente	AcVHC Abbott	AcVHC Ortho	Ag-Ac Monolisa	Inno-LIA	PCR	Observaciones
JRG	N	P	N	N	N	Falso positivo Ortho Historia clínica con diagnóstico anterior de infección por VHC
GCR	P	N	P	P	P	
ARR	P	N	P	P	P	
MFA	P	N	P	P	P	
FJSO	P	N	P	P	N	
DRR	P	N	P	P	N	
CCL	Pd	N	P	I (core)	N	
FTR	Pd	N	P	I (core)	N	

VHC: virus de la hepatitis C; P: positivo; Pd: positivo débil; N: negativo; I: indeterminado; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

TABLA 2. Comparación de los tests Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA y Ortho HCV 3.0 en población hemodializada

		Referencia*	
		(+)	(-)
Monolisa	(+)	24	0
	(-)	0	309

Monolisa S = 100, E = 100, VPP = 100, VPN = 100.

		Referencia*	
		(+)	(-)
Ortho	(+)	17	1
	(-)	7	308

Ortho S = 70.8, E = 99.6, VPP = 94.4, VPN = 97.7.

*Consideramos como resultado de referencia aquel en el que coincidían dos de las técnicas estudiadas (Monolisa/Ortho). En las muestras en que existía discrepancia entre las dos técnicas, se obtuvo considerando los resultados de las técnicas confirmatorias (Inno-LIA, ARN-VHC) y la historia clínica. HCV: hepatitis C virus; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

ró verdadero positivo. En la tabla 2 se detallan los resultados de E, S, VPP y VPN de las técnicas Ortho HCV en población hemodializada y Monolisa HCV. La E de ambos tests fue muy alta (100 y 99,6% para Monolisa y Ortho, respectivamente), por el contrario el test Monolisa HCV se mostró mucho más sensible (100%) en este grupo de pacientes que el test de Ortho HCV (70,8%).

Paneles de seroconversión

En la tabla 3 se muestran los resultados del estudio de los 7 paneles de seroconversión. Destacamos que sólo

18 muestras (24%) fueron detectadas mediante la técnica de anticuerpos Ortho HCV, mientras la técnica de detección simultánea Ag-Ac mostró 43 muestras (57,3%) como positivas. Mediante técnicas de ácidos nucleicos (TAN) se detectó ARN en 44 muestras (datos aportados por los proveedores de los paneles). En 38 de estas 44 muestras se detectó la infección mediante la técnica Monolisa. Cuando estudiamos el panel de seroconversión BBI-917, que constaba de 10 muestras, se detectó la positividad a VHC simultáneamente por Monolisa y TAN en la segunda muestra. La seroconversión para Ortho se produjo en la quinta muestra, coincidiendo con un descenso de carga viral VHC por debajo del límite de detección, esto hace que en este panel Monolisa detecte positivas 9 muestras frente a sólo 4 de las técnicas moleculares. En 3 de los 7 paneles fue más precoz la técnica de determinación de ARN-VHC para detectar la infección VHC que la técnica Monolisa Ag-Ab; en los restantes se detectó simultáneamente por ambas técnicas. La técnica de detección simultánea Ag-Ac reduce el período ventana hasta 72 días comparada con la detección de anticuerpos. El retraso de la técnica Monolisa VHC Ag-Ab respecto a las TAN es de cero a 19 días, aunque hemos de ser cautos al sacar conclusiones ya que este dato, en nuestro estudio, ha dependido de las características de un limitado número de paneles de seroconversión. En 6 muestras encontramos el patrón TAN(+)/Monolisa Ag-Ac(-), 3 correspondieron a resultados Monolisa con índices (s/co) mayores de 0,5 (BBI-919-4, s/co = 0,84; BCP-9055-6, s/co = 0,16; BCP-6213-4, s/co = 0,09; BCP-6213-5, s/co = 0,24; BCP-6213-6, s/co = 0,58; BCP-6213-7, s/co = 0,65).

Discusión

El diagnóstico de la infección por VHC está basado en la demostración de anticuerpos frente a dicho virus me-

TABLA 3. Estudio comparativo de los tests Monolisa HCV Ag/Ab Ultra y Ortho HCV 3.0 frente a paneles de seroconversión

Panel	Nº de sueros	AcVHC Ortho (+)	Ag-Ac Monolisa (+)	Ácidos nucleicos (AN) (+)	Primer positivo	Ag-Ac frente a AN Retraso (días)	Ac frente a Ag-Ac Retraso (días)
BBI 917	10	6	9	4*	AN/Ag	0	72
BBI 919	7	3	3	4	AN	3	0
BCP 6213	12	2	5	9	AN	19	13
BCP 6222	8	1	6	6	AN/Ag	0	23
BCP 6225	19	2	8	8	AN/Ag	0	33
BCP 9041	8	4	7	7	AN/Ag	0	38
BCP 9055	11	0	5	6	AN	3	> 31
Total	75	18	43	44		0-19	0-72

*En 5 muestras posteriores a la detección de Ag y ARN-VHC, y a la seroconversión, no se detectaron AN. HCV: hepatitis C virus.

diente técnicas de enzimoimmunoanálisis (EIA) seguida de pruebas confirmatorias tipo inmunoblot, que confirman la especificidad de la respuesta inmunitaria. Por otro lado, la detección del ARN viral nos permite conocer la actividad o no de la infección^{12,13}. La detección de antígeno VHC también ha sido utilizada como alternativa para la detección directa del virus^{14,15}. Las técnicas directas (ARN y Ag) reducen el período ventana desde 4-8 semanas hasta 1-2 semanas, en el mejor de los casos.

Shah et al¹⁶ describieron una técnica para la determinación simultánea de antígeno y anticuerpos frente al VHC, con la cual se reducía significativamente el período ventana respecto a los métodos que sólo utilizan la detección de anticuerpos, sin pérdida de especificidad ni sensibilidad. Recientemente ha aparecido en el mercado el test para la detección simultánea de antígeno y anticuerpos VHC (Monolisa Ag-Ab VHC ULTRA), como un gran avance para el diagnóstico precoz de la infección por VHC, y para el cribado en bancos de sangre. Nuestro objetivo fue valorarlo como técnica de rutina en dos subgrupos de población. En el primero, población general atendida en nuestra área sanitaria, se encontró una alta correlación con otros tests que sólo detectan anticuerpos. En el subgrupo de pacientes sometidos a hemodiálisis, población con especial importancia por desarrollar una respuesta inmunitaria anormal, se observó una alta especificidad, similar a nuestra técnica de rutina, y una sensibilidad superior a dicho test. Esta mayor sensibilidad no parece deberse a su capacidad para detectar antígeno, ya que las 3 muestras negativas por Ortho y positivas por PCR y Monolisa, también fueron positivas por la técnica de Abbott que sólo detecta anticuerpos frente al VHC; además 4 muestras no virémicas (PCR negativa) fueron positivas mediante la técnica Monolisa y negativas mediante Ortho.

Actualmente, según el Documento de Consenso de la Sociedad Española de Nefrología¹⁷ se aconseja la monitorización del paciente seronegativo mediante determinación de anticuerpos anti-VHC al menos una vez cada 6 meses. En nuestro laboratorio son atendidos un elevado número de pacientes hemodializados (aproximadamente 200), los cuales son monitorizados periódicamente en cuanto a su estado de infección por el VHC, suponiendo una importante carga de trabajo. No es raro encontrar en estos pacientes resultados fluctuantes en la detección de anticuerpos debido a que la respuesta inmunitaria no es buena (niveles bajos de anticuerpos) incluso puede ser incompleta o estar ausente^{18,19}. Los pacientes seronegativos, siguiendo un protocolo establecido, son monitorizados cada 2-3 meses para la detección de anticuerpos VHC. Los pacientes hemodializados tienen un elevado riesgo de adquirir la infección por VHC, independientemente de las transfusiones recibidas (actualmente menos frecuentes que antes), y además desarrollan una respuesta inmunitaria incompleta¹⁹⁻²¹, por ello, parece lógico esperar que el rendimiento diagnóstico global de una técnica capaz de detectar simultáneamente antígeno y anticuerpo en este tipo de población sea superior al de una técnica que sólo detecte anticuerpos y, por supuesto superior al de una técnica de diagnóstico molecular (hasta un 15% pacientes infectados por VHC no presenta viremia) salvo que sean unidades de hemodiálisis de alto riesgo de infección por VHC, dónde se mostrarían más precoces estas últimas. Actualmente no está indicada la monitorización de los pacientes serone-

gativos para VHC, mediante técnicas directas (detección de antígeno o ARN), por lo que una técnica capaz de detectar simultáneamente antígeno y anticuerpos sin un coste excesivo y con una metodología simple facilitaría y mejoraría la monitorización continuada del paciente hemodializado, precisamente por su potencial para detectar con mayor precocidad una posible seroconversión y por su capacidad para detectar a pacientes virémicos crónicamente infectados con niveles bajos de anticuerpos.

En cuanto a la interpretación de resultados, destacamos la óptima discriminación de muestras negativas, ninguna en la zona gris, y prácticamente todos los resultados negativos (> 99,5%) alejados de la zona gris (datos no mostrados). Observamos que la mitad de los resultados discrepantes respecto a otras técnicas más sensibles (TAN) en fases tempranas de la infección ocurren con índices (s/co) entre 0,5 y 0,9, hecho ya descrito por otros autores^{8,11} que proponen que a los pacientes con este tipo de resultados, se les debería hacer un estrecho seguimiento para confirmar si son reacciones inespecíficas o realmente corresponden a una fase temprana de la infección con baja concentración de antígeno circulante. Estos autores⁸ sugieren que se podría bajar el umbral de la zona gris a 0,5 en lugar de 0,9 (s/co).

La reducción del período ventana que se consigue con esta técnica la hace interesante también para otro grupo de pacientes que se estudian en los laboratorios hospitalarios, como son los donantes de órganos. Según nuestros datos, y de acuerdo con otros trabajos publicados^{9,11}, se reduce significativamente el período ventana, aunque no tanto como con la técnica de detección de AgVHC, que prácticamente iguala en sensibilidad a las técnicas de ácidos nucleicos^{14,15}. A pesar de ello, en determinados pacientes la técnica Monolisa Ag-Ac ULTRA detecta simultáneamente la infección por VHC a las técnicas de ácidos nucleicos.

Como conclusión destacamos la utilidad de este nuevo test en el seguimiento de pacientes donde la respuesta inmunitaria es incompleta o incluso puede estar ausente como son los pacientes hemodializados, en los que las técnicas de diagnóstico molecular no están aconsejados de forma rutinaria, ya que permitiría la detección de pacientes virémicos crónicamente infectados con bajas tasas de anticuerpos y pacientes recientemente infectados. Esto repercutiría en un mejor manejo de la infección y riesgos asociados. Por otro lado, su fácil ejecución técnica e interpretación de resultados permite su adaptación a cualquier tipo de laboratorio.

Bibliografía

1. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science*. 1989;244:362-364.
2. Barrera JM, Francis B, Ercilla G, Nelles M, Achord D, Darner J, et al. Improved detection of anti-HCV in post transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *Vox Sang*. 1995;68:15-8.
3. Courouge AM, Pillonel J. Transfusion-transmitted viral infections. *Retrovirus and Viral Hepatitis Working Groups of the French Society of Blood Transfusion*. *N Engl J Med*. 1996;335:1609-10.
4. Assal A, Coste J, Barlet V, Laperche C, Cornillot C, Smilovici W, et al. Application of molecular biology to blood transfusion safety: the nucleic acid testing. *Transfus Clin Biol*. 2003;10:217-26.
5. Stramer SL, Glynn SA, Kleinman SH, Strong DM, Sally C, 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;351:760-8.

6. Álvarez M, Planelles D, Vila E, Montoro J, Franco E. Prolonged hepatitis C virus seroconversion in a blood donor, detected by HCV antigen test in parallel with HCV RNA. *Vox Sang*. 2004;86:266-7.
7. Raker CA, Tabor E, Okayama A, Yu MY, Kohara M, Mueller NE, et al. HCV core antigen as an alternative to NAT to detect HCV viremia. *Transfusion* 2004;44:307-8.
8. Schnuriger A, Domínguez S, Valantín MA, Tubiana R, Duvivier C, Ghosn J, et al. Early detection of hepatitis C virus infection by use of a new combined antigen-antibody detection assay: potential use for high-risk individuals. *J Clin Microbiol*. 2006;44:1561-3.
9. Ansaldi F, Bruzzone B, Testino G, Bassetti M, Gsparini R, Crovari P, et al. Combination hepatitis C virus antigen and antibody immunoassay as a new tool for early diagnosis of infection. *J Viral Hepatitis*. 2006;13:5-10.
10. Laperche S, Le Marrec N, Girault A, Bouchardeou F, Servant-Delmas A, Maniez-Montreuil M, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus (HCV) core antigen and anti-HCV antibodies improves the early detection of HCV infection. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3877-83.
11. Laperche S, Elghouzzi MH, Morel P, Asso-Bonnet M, Le Marrec N, Girault A, et al. Is an assay for simultaneous detection of hepatitis C virus core antigen and antibody a valuable alternative to nucleic acid testing?. *Transfusion* 2005;45:1965-72.
12. Mainez-Montreuil M, Dubois F. Interpretation of hepatitis C virus serology: immunoblot and genome amplification. *Transfus Clin Biol*. 2000;7 Suppl 1:25-30.
13. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology*. 2002;36:S65-S73.
14. Courouze AM, Le Marrec N, Bouchardeou F, Razer A, Maniez M, Laperche S, et al. Efficacy of HCV core antigen detection during preseroconversion period. *Transfusion*. 2000;40:1198-202.
15. Nubling CM, Unger G, Chudy M, Raia S, Lower J. Sensitivity of HCV core antigen and HCV RNA detection in the early infection phase. *Transfusion*. 2002;42:1037-45.
16. Shah DO, Chang CD, Jiang LX, Cheng KY, Muerhoff AS, Gutiérrez RA, et al. Combination HCV core antigen and antibody assay on a fully automated chemiluminescence analyzer. *Transfusion*. 2003;43:1067-74.
17. Barril G, González Parra E, Alcázar R, Arenas D, Campistol JM, Caramelo C, et al. Guías sobre enfermedades víricas en hemodiálisis (HD). *Nefrología*. 2004;24 Suppl 2:43-65.
18. Bukh J, Wantzin P, Krogsgaard K, Knudsen F, Purcell RH, Miller RH. High prevalence of hepatitis C virus (HCV) RNA in dialysis patients: failure of commercially available antibody tests to identify a significant number of patients with HCV infection. *J Infect Dis*. 1993;168:1343-8.
19. Schneeberger PM, Keur I, Van der Vliet W, Van Hoek K, Boswijk H, Van Loon AM, et al. Hepatitis C virus infection in dialysis centers in The Netherlands: a national survey by serological and molecular methods. *J Clin Microbiol*. 1998;36:1711-5.
20. Schneeberger PM, Vos J, Van Dijk WC. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in a Dutch group of hemodialysis patients related to risk factors. *J Hosp Infect*. 1993;25:265-70.
21. Simon N, Courouze AM, Lemarrec N, Trepo C, Ducamp S. A twelve year natural history of hepatitis C virus infection in hemodialyzed patients. *Kidney Int*. 1994;46:504-11.