

DEPARTAMENT DE GENÈTICA

ASPECTOS ANALÍTICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS DE LA
INFECCIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C EN
DONANTES DE SANGRE DE LA COMUNIDAD
VALENCIANA ENTRE 1990 Y 2002

ENRIQUE VILA ROMERO

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de mayo de 2008 davant un tribunal format per:

- D. M^a José Martínez Sebastián
- D. José Manuel Echevarría Mayo
- D. Vicente Mirabet Lis
- D. Adolfo Campos Ferrer
- D^a. María Desamparados Mir Gisbert

Va ser dirigida per:

D^a. Dolores Planelles Silvestre
D. Manuel Álvarez Do Campo

©Copyright: Servei de Publicacions
Enrique Vila Romero

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 978-84-370-7236-4

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT E VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques



Aspectos analíticos y epidemiológicos de la infección por virus de la hepatitis C en donantes de sangre de la Comunidad Valenciana entre 1990 y 2002

TESIS DOCTORAL

Enrique Vila Romero

Valencia, 2007



AVGDA. DEL CID, 65 ACC.
46014 VALÈNCIA
TELÈFON 96 386 81 00

Manuel Álvarez Do Barrio, Doctor en Medicina y Médico Adjunto del Centro de Transfusión de Alicante y Dolores Planelles Silvestre, Doctora en Ciencias Biológicas y Bióloga Adjunta del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

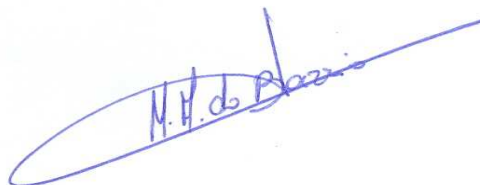
DECLARAN:

Que la presente Tesis Doctoral “Aspectos analíticos y epidemiológicos de la infección por virus de la hepatitis C en donantes de sangre de la Comunidad Valenciana entre 1990 y 2002”, que presenta el Licenciado en Ciencias Químicas Enrique Vila Romero, ha sido realizada bajo nuestra dirección y consideramos que reúne las condiciones necesarias para ser presentada para optar a Grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Valencia a 12 de septiembre de 2007.



Fdo. Dra. Dolores Planelles Silvestre



Fdo. Dr. Manuel Álvarez Do Barrio

“Lo pasado ha huido, lo que esperas está ausente,
pero el presente es tuyo”

Proverbio árabe

A mi mujer Carmen y a mi hija Mariam

Quiero agradecer en primer lugar en la realización del presente trabajo a la Dra. Dolores Planelles y al Dr. Manuel Álvarez, por su excelente dirección y ayuda. Estas personas no solo son los directores de la presente Tesis Doctoral, sino que son verdaderos amigos.

En segundo lugar quiero mostrar mi agradecimiento al Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, concretamente a su Director Médico, el Dr. Roberto Roig y al Jefe de Servicio de Tipificación Celular, el Dr. José A. Montoro, la posibilidad de realizar este estudio. También he de agradecer a la Empresa ABBOTT Científica S.A y a la Fundación de Investigación del Hospital Clínico Universitario por subvencionar la presente Tesis Doctoral.

En tercer lugar quiero dar las gracias a mis compañeros del Servicio de Tipificación Celular del Centro de Transfusión por su ayuda en la realización de la presente Tesis Doctoral: Elvira Alba, Maribel Gómez, Rosa Granell, Lola Jarque, Isabel Llagunes, Rocío Navarro, Cristina Parada, Concha Ramada, Encarna Ruiz, Laura Suñer, Manolo Rodríguez, Manolo Sarrión, Pilar Vicente, el Dr. José Vicente Villalba y la Dra. Nieves Puig. Y también quiero agradecer la ayuda de mis compañeros del Servicio de Hemodonación: los Drs. Iluminada Ample y Amando Blanquer y del Servicio de Informática: Andrés Ascaso e Iván Montoya. No quiero olvidarme de la ayuda recibida por el Dr. Luis Hernández y del personal del Servicio de Informática del Centro de Transfusión de Alicante.

Por último, he de agradecer a mis padres y hermanos el ánimo recibido en la realización de este trabajo, el cual no lo hubiera finalizado sin el apoyo incondicional de mi mujer Carmen, quien ha sufrido mis innumerables ausencias.

Índice

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCIÓN.	3
I.0. Exposición previa.	5
I.1. Microorganismos y otros agentes transmisibles por la sangre y hemoderivados.	6
I.1.1. Virus de la hepatitis C (VHC)	10
I.1.1.1 Descripción del microorganismo.	11
I.1.1.2. Epidemiología y formas de transmisión.	16
I.1.1.3. Evolución y pronóstico de la infección.	18
I.1.1.4. Diagnóstico por el laboratorio.	19
I.2. Medidas para reducir la transmisión del VHC por la sangre y hemoderivados.	22
I.2.1. Medidas previas a la donación adoptadas sobre el donante.	22
I.2.1.1. Selección del tipo de donación: altruista frente a retribuida.	22
I.2.1.2. Selección del donante.	24
I.2.1.3. Autoexclusión confidencial del donante.	26
I.2.1.4. Donación autóloga y autotransfusión.	28
I.2.2. Medidas posteriores a la donación con respecto al donante: Pruebas de laboratorio.	30
I.2.2.1. Pruebas serológicas de cribado y marcadores indirectos. anticuerpos frente a VHC y antígeno del mismo.	30
I.2.2.2. Determinación de la concentración de actividad de ALT.	38
I.2.2.3. Sensibilidad de las pruebas de cribado. Los periodos de ventana serológica.	41
I.2.2.4. Pruebas complementarias o de confirmación: inmunoblot. Limitaciones de las pruebas complementarias.	43
I.2.2.5. Actitud ante los donantes con resultados anómalos en las pruebas serológicas.	48
I.2.2.6. Pruebas basadas en la tecnología NAT.	49

I.2.2.7. Implantación de las pruebas basadas en la tecnología NAT en los centros de donación. Determinaciones individuales y determinaciones en mezclas de plasma de varios donantes.	64
I.2.3. Medidas adoptadas sobre los hemoderivados.	67
I.2.3.1. Manipulación y preparación correcta.	68
I.2.3.2. Plasma fresco congelado en cuarentena.	71
I.2.3.3. Plasma fresco congelado solidarizado.	71
I.2.3.4. Atenuación de la carga vírica.	71
I.2.4. Medidas en relación con el receptor.	73
I.3. El riesgo residual de transmisión del VHC por hemoderivados.	74
I.3.1. Definición del riesgo residual.	74
I.3.2. Causas del riesgo residual.	74
I.3.3. Cálculo del riesgo residual.	75
I.3.3.1. Métodos tradicionales para el cálculo del riesgo de infección.	78
I.3.3.2. Métodos basados en modelos epidemiológicos.	79
I.3.3.2.1. Modelo de los Centros para el Control de Enfermedades y Cruz Roja Americana.	79
I.3.3.2.2. Modelo del Grupo para el Estudio de la Epidemiología de Retrovirus en Donantes (REDS). Variables críticas del mismo.	80
I.3.3.2.3. Otros modelos.	82
I.3.4. Situación actual del riesgo de transmisión del VHC por hemoderivados.	84
I.3.5. Repercusión de la introducción de nuevas pruebas de cribado sobre el riesgo residual.	85
II. OBJETIVOS.	87
III. MATERIAL Y MÉTODOS.	91
III.1 Material.	93
III.1.1 Organización de la donación de sangre en la Comunitat Valenciana. Centros de transfusión.	93
III.1.2. Sistemas de registro de la información demográfica y de la información relativa a enfermedades infecciosas detectadas en donantes.	94
III.1.2.1. Sistema informático.	94
III.1.2.2. Sistemas manuales de registro.	96
III.1.3. Perfil de los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana.	97

III.1.4. Número de donaciones anuales en el periodo 1990-2002 en los Centros de Transfusión de la Comunitat Valenciana.	99
III.1.5. Número anual de donantes durante el periodo de tiempo considerado.	99
III.1.5.1. Donantes repetidores.	100
III.1.5.2. Donantes nuevos.	100
III.1.5.3. Número total de donantes. Porcentaje de donantes nuevos y donantes repetidores por año.	101
III.1.6. Cálculo de la magnitud donante-días para la determinación de la tasa cruda y corregida de incidencia.	102
III.1.7. Número de donaciones analizadas por la prueba NAT de cribado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en los periodos 1999-2002 y 1999-2006. Tamaño de los <i>pools</i> de unidades de sangre.	103
III.2. Métodos.	105
III.2.1. Cuantificación de las donaciones con la prueba de cribado de anticuerpos anti-VHC positiva.	105
III.2.2. Cuantificación de los donantes con la prueba serológica VHC de confirmación positiva.	106
III.2.3. Cálculo de la especificidad de las pruebas de cribado para VHC.	108
III.2.4. Valoración de la utilidad de la determinación de ALT, como marcador indirecto de infección por VHC en donantes de sangre.	109
III.2.5. Cálculo de la prevalencia de la infección por VHC en donantes de sangre.	110
III.2.6. Cálculo de la tasa cruda de incidencia de la infección por VHC en donantes de sangre.	111
III.2.7. Cálculo de la tasa corregida de incidencia de la infección por VHC en donantes de sangre.	112
III.2.8. Cálculo del riesgo residual de transmisión del VHC por transfusión sanguínea.	113
III.2.9. Estimación de la reducción del riesgo con la introducción de nuevas pruebas de cribado.	113
III.2.10. Seguimiento de donantes implicados en hepatitis C asociada a transfusión.	115
III.2.11. Seguimiento de receptores de unidades seronegativas obtenidas previamente a seroconversiones.	116
III.2.12. Cálculo de la sensibilidad de la prueba NAT de cribado PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche.	117
III.2.13. Determinación de la fiabilidad de la técnica de la prueba NAT de cribado PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche.	117

III.2.14. Determinación de los tiempos de proceso y los recursos humanos necesarios para la introducción de la prueba NAT de cribado PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.	118
III.2.15. Seguimiento de los donantes de sangre en periodo ventana serológico detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.	118
III.2.16. Métodos estadísticos.	119
IV. RESULTADOS.	121
IV.1. Número de donaciones con la prueba serológica VHC de cribado positiva.	123
IV.2. Número de seroconversiones VHC en los periodos de estudio.	123
IV.3. Número de donantes nuevos con la prueba serológica VHC de confirmación positiva.	124
IV.4. Número de donaciones con resultado positivo en la prueba de confirmación serológica y en la prueba NAT.	124
IV.5. Especificidad de las pruebas de serológicas de cribado para detección de anticuerpos anti-VHC.	125
IV.6. Resultado de las pruebas serológicas de confirmación para anticuerpos anti-VHC en las donaciones de sangre.	126
IV.7. Número de donaciones con valores de ALT superiores al valor de corte.	127
IV.8. Número de donaciones VHC confirmados con los valores de ALT superiores al valor de corte.	128
IV.9. Número de donaciones con la prueba NAT positiva y la ALT alterada.	129
IV.10. Correlación entre la concentración de ALT y los resultados positivos en la prueba de confirmación VHC.	130
IV.11. Número de donaciones en periodo ventana serológico detectadas en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en los periodos 1999-2002 y 1999-2006.	133
IV.12. Prevalencia anual de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana durante el periodo 1991-2002.	134
IV.13. Tasas crudas y corregidas de incidencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.	135
IV.14. Estimación del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunidad Valenciana en los periodos de estudio.	138

IV.14.1 Estimación del riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia.	138
IV.14.2. Estimación del riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia.	140
IV.15. Estimación de la reducción del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana con la introducción de nuevas pruebas de cribado.	143
IV.15.1. Reducción del riesgo residual de transmisión de VHC con la introducción de las pruebas NAT en la Comunitat Valenciana: Rendimiento esperado.	143
IV.15.2. Rendimiento observado con la introducción de las pruebas NAT.	144
IV.16. Hepatitis C asociadas a transfusión en la Comunitat Valenciana en el periodo 1990-2002.	145
IV.17. Seguimiento de las seroconversiones detectadas por los Centros de Transfusión de la Comunitat Valenciana durante el periodo 1999-2002.	148
IV.18. Implantación de las pruebas NAT de cribado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.	151
IV.18.1. Sensibilidad de la prueba NAT de cribado.	151
IV.18.2. Determinación de la fiabilidad de la la prueba NAT de cribado.	152
IV.18.3. Determinación de los tiempos de proceso y los recursos humanos necesarios para la introducción de la prueba NAT de cribado.	153
IV.19. Seguimiento de los donantes de sangre en periodo ventana serológico detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.	154
V. DISCUSIÓN Y COMENTARIOS.	159
V.1. Características de la población de donantes.	161
V.2. Discusión de los métodos.	162
V.2.1. Recogida de datos relativos a donantes y donaciones.	162
V.2.2. Limitaciones del modelo utilizado para el cálculo del riesgo residual.	162
V.3 Discusión de los resultados.	164
V.3.1. Especificidad de las pruebas serológicas de cribado.	164
V.3.2. Resultados de las pruebas serológicas de confirmación.	165

V.3.3. Valoración de la utilidad de la determinación de la concentración de actividad de la ALT como marcador indirecto de infección por VHC en donantes de sangre.	166
V.3.4. Prevalencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en el periodo 1991-2002.	169
V.3.5. Tasas crudas y ajustadas de incidencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.	172
V.3.6. Estimación del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.	175
V.3.7. Estimación de la reducción del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana con la introducción de nuevas pruebas de cribado.	177
V.3.8. Sensibilidad de la prueba NAT de cribado.	179
V.3.9. Determinación de la fiabilidad de la técnica de la prueba NAT de cribado.	181
V.3.10. Determinación de los tiempos de proceso y los recursos humanos necesarios para la introducción de la prueba NAT de cribado.	183
V.3.11. Seguimiento de los donantes de sangre en periodo ventana detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.	183
V.3.12. Casos de hepatitis C asociados a transfusión sanguínea en el periodo 1990-2002.	186
V.3.13. Número de seroconversiones para el VHC comunicadas por los Centros de Transfusión de la Comunidad Valenciana a los centros receptores de hemoderivados de donaciones previas a la seroconversión en el periodo 1999-2002.	186
VI. CONCLUSIONES.	189
VII. RESUMEN.	193
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	197

ABREVIATURAS

Abreviatura	Descripción
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
ADNds	Ácido DesoxirriboNucleico de doble cadena
ALT	Alanina aminotransferasa
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNds	Ácido RiboNucleico de doble cadena
ARNss	Ácido RiboNucleico de simple cadena
cADNds	Ácido DesoxirriboNucleico complementario de doble cadena
cADNss	Ácido DesoxirriboNucleico complementario de simple cadena
dNTPs	DesoxirriboNucleótidos
CLhIA	Inmunoanálisis por quimioluminiscencia
D	Número de donaciones totales
E	Especificidad
EIA	Enzimoinmunoanálisis
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FTA	<i>Fluorescent Treponema Antibody</i>
HbsAg	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B
HTLV1/2	Virus Linfotrópico T Humano tipo 1 y 2
I	Tasa de incidencia de infección
Ia	Tasa corregida de incidencia de infección
Ic	Tasa cruda de incidencia de infección
IgA	Inmunoglobulina de tipo A
IgG	Inmunoglobulina de tipo G
IgM	Inmunoglobulina de tipo M
IFA	Ensayo de inmunofluorescencia
LCR	Reacción en cadena de la Ligasa
NASBA	<i>Nucleic acid sequence-based amplification</i>
NAT	Técnicas de detección de ácidos nucleicos

Abreviatura	Descripción
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	o-fenilendiamina
P	Prevalencia
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
R _{ESP}	Rendimiento esperado
RIBA	<i>Recombinant immunoblot Assay</i>
RI	Nº de donaciones RIBA indeterminado
R _{OBS}	Rendimiento observado
RP	Nº de donaciones RIBA positivo
RPR	Reagina Plasmática Rápida
rr	Número de donaciones repetidamente reactivas
RR	Riesgo residual de infección
RR _A	Riesgo residual de infección teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia
RR _C	Riesgo residual de infección teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia
SDA	Amplificación por desplazamiento de la cadena
SODh	Superóxido dismutasa humana
TMA	Amplificación mediante la transcripción
TPHA	<i>Treponema Pallidum Haemagglutination</i>
VHA	Virus de la Hepatitis A
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VIH1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
VNW	Virus del Nilo Occidental
WP	Periodo ventana de infección

I. INTRODUCCIÓN

I.0. Exposición previa.

En la actualidad el riesgo de infección de las enfermedades comúnmente transmitidas por transfusión es más bajo que nunca. Sin embargo los hemoderivados continúan expuestos a contaminación por patógenos emergentes conocidos y por patógenos todavía no identificados¹. La adecuada selección de los donantes de sangre, la puesta en marcha de pruebas de detección sensibles en el cribado de las donaciones de sangre y la utilización de procedimientos de inactivación de patógenos en los hemoderivados, pueden eliminar o reducir el riesgo de transmisión de patógenos por transfusión. Si además se añade una vigilancia de los efectos adversos en la transfusión de sangre y una información actualizada de los agentes infecciosos que pueden ser transmitidos por transfusión sanguínea, los hemoderivados pueden llegar a ser más seguros frente a patógenos conocidos y patógenos emergentes transmisibles por transfusión¹.

El descenso del riesgo de infección asociada a transfusión ha dado lugar a un aumento considerable en la complejidad de los cálculos necesarios para estimar dicho riesgo, obligando a desarrollar estrategias alternativas basadas en modelos que tienen en cuenta la incidencia de enfermedades infecciosas en donantes y los datos sobre la duración de los periodos de seroconversión. Con estos modelos se puede estimar el riesgo residual o riesgo de transmisión de infecciones por transfusión que presentan las unidades de sangre previamente analizadas con las pruebas preceptivas en un momento dado²⁻⁴.

La hepatitis C es una enfermedad infecciosa causada por un virus que afecta principalmente al hígado; tiene extensión mundial y está reconocida como uno de los principales problemas mundiales de salud⁵. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 3% de la población mundial (aproximadamente 170 millones de personas) son portadores crónicos de la enfermedad. La transmisión de la enfermedad ocurre principalmente por exposición parenteral a sangre (jeringuillas contaminadas y hemoderivados contaminados)⁶. Con la identificación en 1988 mediante técnicas de biología molecular del VHC, la secuenciación de su genoma y el desarrollo de las pruebas de detección de anticuerpos frente al VHC, se llegó a las siguientes conclusiones⁷:

1. El VHC era el agente responsable del 80% de las hepatitis no-A no-B.

2. El VHC estaba ampliamente extendido en la población de donantes de sangre.

3. El VHC estaba implicado en más del 90% de las hepatitis postransfusionales.

4. La infección crónica de VHC, aunque es generalmente asintomática, podía desencadenar una cirrosis o un carcinoma hepatocelular.

En septiembre de 1990 se estableció por ley la detección de anticuerpos frente al VHC en todas las donaciones de sangre de la Comunitat Valenciana⁸ (Orden 1685 de 21 junio de 1990). Desde entonces se ha ido mejorando la sensibilidad y la especificidad de las pruebas serológicas de cribado y de confirmación de la infección por VHC, hasta la introducción en 1999 de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos (prueba NAT) de detección del ARN-VHC en el cribado de todas las donaciones de sangre, la cual disminuyó el riesgo de transmisión del virus de la hepatitis C a valores muy bajos. Estos hechos han conducido a la elaboración del presente trabajo, en el que se estudiará la infección por VHC en los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en el periodo 1990-2002, determinándose la prevalencia y la incidencia de la infección VHC en los donantes de sangre, el riesgo residual de transmisión de la infección por transfusión de hemoderivados, la especificidad de las pruebas serológicas de detección de anticuerpos anti-VHC, la importancia de la prueba de cuantificación de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) como marcador de la infección por VHC y se valorará la implantación de las pruebas NAT de detección de ARN-VHC en el cribado de todas las donaciones de sangre.

I.1. Microorganismos y otros agentes transmisibles por la sangre y hemoderivados.

La medicina transfusional, desde su desarrollo en la segunda mitad del siglo XX ha encontrado como uno de sus principales problemas la transmisión de enfermedades infecciosas a través de los hemoderivados¹.

Los patógenos relevantes considerados en transfusión sanguínea son: VHC, virus de la Hepatitis B (VHB), virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2 (VIH1/2), virus linfotrópico T humano 1 y 2 (HTLV1/2), *Tripanosoma cruzi* y

Treponema pallidum, los cuales tienen en común que provocan enfermedades crónicas y asintomáticas en los donantes de sangre⁹.

Otros patógenos recientemente considerados como transmisibles por transfusión son: virus de la hepatitis A (VHA), parvovirus B19, virus del nilo occidental (VNW), Plasmodium y los priones que provocan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob⁹.

El hecho de considerar relevante a un patógeno transmisible por transfusión, debe estar acompañado de un estudio riguroso que debe incluir⁹:

1. La determinación de la prevalencia e incidencia del agente infeccioso en la población general y en los donantes de sangre.

2. En el caso que el agente infeccioso esté presente en los donantes de sangre, se debe determinar la probabilidad de transmisión por transfusión mediante estudios de inoculación del patógeno en animales, mediante estudios prospectivos de infección en los receptores y por medio de análisis de serotecas de receptores de hemoderivados de alto riesgo (hemofílicos).

3. Si el agente infeccioso es transmisible por transfusión, se debe determinar las consecuencias de la enfermedad en la población infectada y en la población expuesta al patógeno.

4. Si se determina un riesgo importante de transmisión del patógeno en los receptores de hemoderivados, se deben evaluar y poner en práctica pruebas de detección del agente infeccioso en el cribado de los donantes de sangre y se debe investigar en los métodos de inactivación y eliminación de dicho agente en los hemoderivados (plasma y componentes celulares de la sangre).

A continuación se exponen los patógenos transmisibles por transfusión conocidos hasta el momento actual, indicándose el tipo de patógeno, las vías de transmisión del mismo, la enfermedad que provocan, si se detectan en las pruebas de cribado de las donaciones de sangre y si son efectivas las técnicas de inactivación del plasma:

Tabla 1: Bacterias transmisibles por transfusión sanguínea.

Patógeno	Tipo	Vía de transmisión	Enfermedad	Prueba de detección en rutina	Procesos de inactivación del plasma efectivos
Bacterias aerobias y anaerobias	1. Bacterias Gram positivas. 2. Bacterias Gram negativas	1. Entorno 2. Parenteral 3. Manipulación 4. Venopunción	Sepsis	No	Si
<i>Treponema Pallidium</i>	Espiroqueta	1. Sexual 2. Parenteral	Sífilis	Si RPR, FTA, TPHA	Si

Tabla 2: Parásitos transmisibles por transfusión sanguínea.

Patógeno	Tipo	Vía de transmisión	Enfermedad	Prueba de detección en rutina	Procesos de inactivación del plasma efectivos
1. <i>Plasmodium vivax</i> 2. <i>Plasmodium oval</i> 3. <i>Plasmodium falciparum</i> 4. <i>Pasmodium malariae</i>	Protozoo	1. Mosquito 2. Parenteral	Paludismo	No	Si
<i>Tripanosoma cruzi</i>	Protozoo	1. Vinchuca 2. Parenteral 3. Perinatal	Enfermedad de Chagas	Si ELISA, IFA, PCR	Si
<i>Leishmania donovani</i>	Protozoo	1. Mosquito 2. Parenteral	Leishmaniosis	No	Si

Tabla 3: Virus transmisibles por transfusión sanguínea.

Patógeno	Genoma	Tipo	Vía de transmisión	Enfermedad	Prueba de detección en rutina	Procesos de inactivación del plasma efectivos
VHC	ARNss	Flavivirus	1. Parenteral	Hepatitis C	Si ELISA, NAT	Si
VHB	ADNds	Hepadnavirus	1. Parenteral 2. Sexual 3. Perinatal 4. Horizontal	Hepatitis B	Si ELISA, NAT	Si
VHA	ARNss	Picornavirus	1. Fecal-oral 2. Parenteral	Hepatitis A	No	No
VHD	ARNss	Deltavirus	1. Parenteral	Hepatitis D	No	Si
VHE	ARNss	Hepevirus	1. Fecal-oral 2. Parenteral	Hepatitis E	No	No
VIH 1 y 2	ARNds	Retrovirus	1. Parenteral 2. Sexual 3. Perinatal	SIDA (Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida)	Si ELISA, NAT	Si
HTLV 1 y 2	ARNds	Retrovirus	1. Parenteral 2. Sexual 3. Perinatal	1. Linfoproliferación maligna 2. Neuropatía	No*	Si
PV- B19	ADNss	Parvovirus	1. Horizontal 2. Perinatal 3. Parenteral	1. Eritema infeccioso	No	No
WNV	ARNss	Flavivirus	1. Mosquito 2. Parenteral	1. Encefalitis 2. Meningitis	No*	Si

(*) La prueba de detección en rutina no se determina en España, aunque si en otros países

Tabla 4: Priones transmisibles por transfusión sanguínea.

Patógeno	Tipo	Vía de transmisión	Enfermedad	Prueba de detección en rutina	Procesos de inactivación del plasma efectivos
Prión	Proteína	1. Oral 2. Parenteral	1. Enfermedad Creutzfeldt-Jakob (ECJ) 2. Variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob (vECJ)	No	¿Si?*

(*) Actualmente en estudio.

En el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana se ha ido incorporando pruebas de detección de patógenos transmisibles por transfusión en el cribado de los donantes de sangre, según se ha determinado su relevancia. Actualmente los agentes transmisibles por transfusión que se determinan en el cribado de todos los donantes de sangre son: VHC, VHB, VIH, *Treponema pallidum*, mientras que la determinación de *Tripanosoma cruzi* se realiza en la población de donantes de sangre con riesgo de transmitir la enfermedad de Chagas (personas nativas o con madres provenientes de las zonas endémicas de la enfermedad y personas que han viajado a estas zonas endémicas).

I.1.1. El virus de la hepatitis C (VHC).

La hepatitis no-A no-B es conocida desde 1974, aunque en aquellas fechas se desconocía el agente responsable de la enfermedad¹⁰. Estudios prospectivos realizados en Estados Unidos con muestras obtenidas durante la década de los 70 demostraron que el 90% de los casos de hepatitis postransfusional estaban producidos por el virus de la hepatitis C. Para disminuir el riesgo de transmisión de la hepatitis no-A no-B los bancos de sangre de Estados Unidos, en 1986, introdujeron en el cribado de las donaciones de sangre la determinación de ALT y de los anticuerpos frente al core del VHB, como marcadores indirectos de la enfermedad¹⁰.

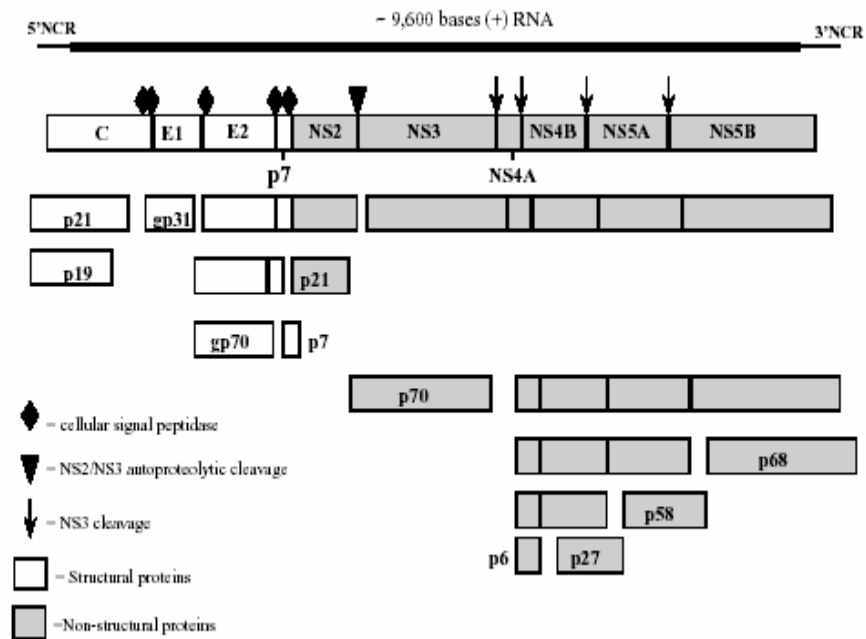
El agente responsable de la hepatitis C no fue identificado hasta 1989, mediante clonación de una parte del genoma del virus de la hepatitis C a partir de plasma de chimpancé infectado experimentalmente¹¹. Posteriormente se confirmó al VHC como la mayor causa de la hepatitis no-A no-B asociada a la transfusión¹².

I.1.1.1. Descripción del microorganismo.

La partícula del VHC es un virus pequeño que tiene un diámetro de alrededor de 50 nm¹³. Presenta una cubierta lipídica derivada de la membrana de la célula huésped, la cual es insertada en el virus por las glicoproteínas codificadas por él mismo y que circundan la nucleocápside del virus¹³; esta característica le confiere una densidad más baja que el resto de los virus de la familia Flavivirus (1.09-1.11 g/cm³)¹⁴. Por técnicas de rotación óptica se ha visto que la estructura de la nucleocápside del VHC es icosaédrica¹³ y tiene un diámetro aproximado de 35-40 nm.

El genoma del VHC es una molécula de ARN de cadena simple (ARNss), de sentido positivo y de aproximadamente 9600 bases de longitud¹³. El genoma del VHC contiene dos regiones no traducidas muy conservadas (UTR: UnTranslated Region) en la región 5' y en la región 3'. Dichas regiones flanquean una región, que se traduce, de una sola secuencia de traducción (ORF: Open Reading Frame) y que cubre casi la totalidad del genoma y es capaz de codificar un precursor de una larga poliproteína de 3010 aminoácidos^{11, 12, 14}. Esta poliproteína es procesada durante o después de la traducción por proteasas de la célula infectada y proteasas víricas produciendo distintos productos codificados por los genes víricos. Estos productos codificados por el genoma vírico son proteínas estructurales (una proteína del core y dos proteínas putativas de cubierta, E1 y E2) que están localizadas en la región N-terminal y proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4 A, NS4 B, NS5 A y NS5 B) localizadas en la región C-terminal de la poliproteína traducida (figura 1).

Figura 1: Diagrama de los genes del ARN VHC y sus productos de traducción¹³ (*).



(*) El diagrama indica la estructura de la poliproteína y su procesamiento por medio de señales celulares para peptidasas y para proteinasas codificadas por el virus (NS2/3 y NS3/4A). Se indican los tamaños aproximados de las proteínas víricas (p) y de las glicoproteínas (gp).

Las funciones de las proteínas estructurales y no estructurales y de las regiones no traducidas 5' UTR y 3' UTR del genoma del VHC están resumidas en la tabla 5.

Tabla 5: Función y tamaño de las distintas proteínas y de las regiones UTR del genoma del VHC¹³.

Región genómica/proteína	Posición nucleotídica ^a	Posición de los aminoácidos del producto final en la poliproteína VHC ^a	Tamaño aprox. con SDS PAGE ^b	Funciones
5'UTR	1-341	- ^c	- ^c	Iniciación de la traducción, replicación ^p
C	342-857	1-191/179/182	p21/p19	Estructural, encapsulación del ARN viral ^p
E1	915-1490	192-383	gp31*	Estructural, unión con el receptor, entrada celular ^p
E2	1491-2579	384-746	gp70*	Estructural, unión con el receptor, entrada celular ^p
E2-p7	1491-2768	384-809	gp70*	Desconocida, posible precursor o función estructural
p7	2580-2768	747-809	p7	Posible canal de calcio de la membrana
NS2	2769-3419	810-1026	p21	Parte de la NS2-3 proteasa
NS3	3420-5312	1027-1657	p70	Parte de la NS2-3 proteasa, serin-proteasa, helicasa, NPTasa
NS4A	5313-5476	1658-1711	p6	Cofactor de la serin-proteasa
NS4B	5477-6257	1712-1972	p27	Componente de la replicasa ^p
NS5A	6258-7600	1973-2420	p58	Componente de la replicasa ^p
NS5B	7601-9374	2421-3011	p68	ARN polimerasa ARN dependiente
3'UTR	9375-9621	-	-	Replicación ^p , empaquetamiento del genoma viral ^p

^a Referido a la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la cadena HCV-H del genotipo 1a.

^b Electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil-sulfato de sodio.

^c La región 5'UTR contiene varias regiones ORF cortas.

* Indica que las proteínas están N-glicosiladas.

^p Designa funciones putativas basada en comparaciones con otros virus.

El VHC es miembro de la familia *Flaviviridae*, la cual está compuesta por tres géneros distintos¹⁴.

1. Flavivirus clásicos: virus de la fiebre amarilla, virus del dengue y el virus de la encefalitis japonesa.

2. Pestivirus de animales: virus de la diarrea bovina, virus del cólera porcino.

3. Hepacivirus: VHC.

Los virus de la familia *Flaviviridae* presentan las siguientes características:

1. Son virus pequeños y contienen una cubierta con un genoma de ARNss con una secuencia de traducción ORF.

2. El genoma de estos virus contiene tres dominios homólogos conservados: dominio helicasa, dominio serina-proteasa y un dominio catalítico característico de ARN polimerasa-ARN dependiente.

3. Los genes que codifican para las proteínas estructurales están localizados en la región N-terminal de la poliproteína y los genes que codifican para las proteínas no estructurales están localizados en la región C-terminal.

4. El perfil hidrofóbico de la poliproteína codificada es similar en los tres grupos de virus de esta familia.

El proceso de replicación del virus de la hepatitis C no es totalmente conocido. El VHC no produce productos intermedios de replicación de ADN y el ARN vírico no se integra directamente en el genoma de la célula huésped. El VHC, como el resto de Flavivirus, se replica mediante un ARN intermediario de cadena negativa. Las proteínas involucradas en la replicación del ARN deben ser traducidas para que ocurra la replicación. En el VHC tanto las proteínas estructurales como las proteínas no estructurales son necesarias para la replicación del ARN¹³.

El ARN del VHC muestra una gran heterogeneidad, aunque esta variabilidad no está igualmente distribuida en todo el genoma. Las regiones relativamente conservadas del genoma del VHC (core, E1 y NS5) han sido estudiadas y se han usado como base para una clasificación genotípica. Hay al menos seis genotipos conocidos^{5, 15} que pueden ser divididos en subtipos. En esta clasificación hay que tener en cuenta que en los virus circulantes en una misma persona, puede haber variaciones en la secuencia de nucleótidos y que pueden darse cuasiespecies que son resultado de mutaciones víricas⁵.

Aunque no hay una definición estricta y universalmente aceptada de los genotipos y sus subtipos, el análisis filogenético evolutivo de las secuencias de nucleótidos ha permitido dividir el genoma VHC en seis grupos que son identificados como genotipos (1-6), mientras que los subtipos (a, b, c, etc) representan grupos con secuencias similares dentro de cada genotipo⁵. La mayoría de los infectados por VHC presentan un solo genotipo de VHC⁵.

La determinación de los genotipos tiene interés epidemiológico, ya que la prevalencia de los mismos varía considerablemente en las diferentes partes del mundo (Tabla 6)^{5, 15}. En España el genotipo prevalente es el 1b (Tabla 7)¹⁵.

El genotipo vírico está relacionado con la patogénesis de la enfermedad⁶, ya que se ha comprobado que en infecciones con el genotipo 1b es más probable desarrollar una cirrosis o un carcinoma hepatocelular⁵. También se ha comprobado que el genotipo vírico influye en la respuesta al tratamiento de la enfermedad con interferón, siendo los genotipos 1a, 1b y 4 los de peor respuesta^{6, 13}.

Tabla 6: Distribución de genotipos VHC predominantes en el mundo^{5, 15}

Genotipo VHC	Predominio geográfico
1a	América, Norte y Centro de Europa
1b	Europa Oriental, Extremo Oriente, Países mediterráneos.
2	Poco común
3	Subcontinente Indio. Extendido en usuarios de droga por inyección en el Hemisferio Oeste.
4	África, algunos países mediterráneos.
5	Sudáfrica
6	Asia

Tabla 7: Prevalencia de los genotipos VHC en España (1996-2004)¹⁵

Genotipo VHC	Prevalencia en España (1996-2004)
1a	24,1 %
1b	41,3 %
2	3,1 %
3	19,6 %
4	11,6 %
5	0,3 %
6	Ningún caso

I.1.1.2. Epidemiología y formas de transmisión.

La OMS estima que alrededor de 170 millones de personas (aproximadamente el 3 % de la población mundial) son portadores crónicos del VHC¹⁶. En España, la prevalencia de la infección por VHC varía entre el 1,6% y el 2,6% de la población general¹⁷. De las personas infectadas por VHC, más de un 50% se convierte en portador crónico de la enfermedad. De los portadores crónicos del VHC, del 10 al 20 % desarrollará cirrosis y del 1 al 4 % desarrollará un carcinoma hepatocelular en un periodo de tiempo de 10 a 20 años⁶.

Tabla 8: Prevalencia estimada de Hepatitis C y número de infectados en el área OMS. Fuente: Informe epidemiológico semanal. N° 49, 10 de diciembre de 1999, OMS.

Area OMS	Población Total (millones)	Prevalencia (%)	Población infectada (millones)	Nº de países sin datos (OMS)
África	602	5.3	31.9	12
América	785	1.7	13.1	7
Mediterráneo Oriental	466	4.6	21.3	7
Europa	858	1.03	8.9	19
Sudeste asiático	1500	2.15	32.3	3
Pacífico occidental	1600	3.9	62.2	11
Total	5811	3.1	169.7	57

La vía principal de infección por VHC es la vía parenteral a partir de sangre infectada. Se han dado casos de hepatitis C adquirida a través de vías no parenterales, como son transmisión sexual y perinatal, pero estas vías no han sido muy bien definidas.

En parejas sexualmente estables de pacientes con hepatitis C no hay riesgo sustancial por esta vía de transmisión⁶. En contactos con múltiples parejas sexuales la transmisión de VHC puede ocurrir con un riesgo alrededor del 5%.

La transmisión materno-filial del VHC es rara y se da sólo en mujeres con alta viremia. Alrededor del 5% de los recién nacidos de madres infectadas con el VHC se infectan al nacer⁶.

Existe un porcentaje del 30 al 40 % de casos en que la vía de infección no

puede ser confirmada, que pueden deberse a consumo de drogas no notificadas en la historia, exposiciones percutáneas no apreciables u ocultas u otras vías de transmisión del VHC no conocidas¹⁴.

No existe todavía una vacuna frente al VHC debido a la gran variabilidad de la envoltura del virus, por lo que toda la población es susceptible a la enfermedad⁶. De los seis genotipos principales de VHC, los genotipos 1, 2 y 3 tienen una distribución mundial, siendo el genotipo 1 (1a y 1b) el más frecuente⁶.

Los grupos de personas de mayor riesgo de contraer la infección por VHC son:

1. Receptores de transfusión de hemoderivados contaminados. Antes de la introducción de las pruebas de cribado frente a los anticuerpos anti-VHC, aproximadamente del 3% al 13 % de personas que recibieron transfusiones de sangre llegaban a ser portadoras de VHC en estudios retrospectivos. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC es muy alta en pacientes politransfundidos antes de 1990, como los talasémicos (80 %), enfermos de leucemia (75 %) y hemofílicos tratados con concentrados de factores de coagulación no inactivados o inactivados de forma incompleta (80-90 %)¹⁴.

2. Usuarios de drogas intravenosas que comparten material contaminado. En este grupo se da un riesgo muy alto de infección. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC es del 70-90 %¹⁴.

3. Pacientes en hemodiálisis y pacientes receptores de trasplante de órganos. La infección por VHC es frecuente en pacientes en hemodiálisis crónica. La prevalencia de anticuerpos anti-VHC en este grupo varía entre el 30% y el 50%. No está claro si dicha prevalencia se debe a la diseminación del VHC por diálisis o a las frecuentes transfusiones sanguíneas en esta población. El uso de máquinas de diálisis separadas para pacientes con anticuerpos anti-VHC podría disminuir el riesgo de infección¹⁴.

Los receptores de trasplante de órganos son considerados de alto riesgo de infección por VHC. Una proporción de estos receptores están infectados antes del trasplante (hemodiálisis) y otra proporción de ellos se infectan por el uso de órganos provenientes de donantes infectados por VHC¹⁴.

4. Personas expuestas a material quirúrgico o dental contaminado o sin esterilizar⁶. Se han dado casos de infección por VHC en pacientes tras una intervención (transmisión nosocomial)¹³. En personal sanitario también se han

dado casos de infección por VHC por exposición a agujas y material quirúrgico con sangre contaminada (transmisión ocupacional)^{13,14}.

5. Personas que realizan y reciben tatuajes o acupuntura con material no esterilizado⁶.

I.1.1.3. Evolución y pronóstico de la infección.

La hepatitis causada por la infección por VHC es autolimitada entre el 20 al 50% de los casos y no confiere inmunidad permanente. La infección se hace crónica entre el 50 y 80% de los casos, causando cirrosis en el 10 al 20% de estos pacientes y carcinoma hepatocelular en el 1 al 4% de los casos con cirrosis⁶.

El periodo inicial de infección por VHC suele ser asintomático, aunque en un tercio de los enfermos con hepatitis C aguda se dan síntomas clínicos similares a otras hepatitis víricas agudas, como son náuseas, dolor en el cuadrante derecho del abdomen o ictericia. Las hepatitis C agudas suelen resolverse entre 2 y 12 semanas, no suelen dejar secuelas y los pacientes cuando se recuperan no parecen estar protegidos de posibles re-infecciones por VHC⁶.

La mayoría de los pacientes con hepatitis C crónica permanecen asintomáticos. Del 10 al 20% de estos pacientes llegan a padecer enfermedades hepáticas graves. Los síntomas que se dan en los pacientes crónicos con cirrosis son fatiga y cuadros hepáticos más típicos, como náuseas, anorexia, dolor en el cuadrante derecho del abdomen, coluria y prurito.

La evolución de los pacientes con hepatitis C es difícil de predecir, pero distintos estudios prospectivos muestran cómo el curso de la enfermedad suele ser progresivo. El periodo de tiempo medio de evolución a cirrosis se ha estipulado entre 10 y 20 años, aunque va a depender de distintos factores como edad, sexo, lesión en el momento del diagnóstico, coinfección con otros virus, etc. El carcinoma hepatocelular es la complicación más seria de la infección por VHC y está estrechamente relacionado con la cirrosis hepática.

El marcador bioquímico que se ha relacionado con el daño hepático provocado por la infección por VHC es la elevación de la concentración de ALT en suero, cuyo incremento suele ser menos marcado que en las hepatitis A y B. Los valores de ALT suelen fluctuar en los pacientes con infección crónica por

VHC y no hay una concentración que se relacione con una forma benigna de la enfermedad.

La infección por VHC puede provocar distintos síndromes clínicos no hepáticos que se dan raramente⁶:

1. Crioglobulemia esencial mixta, la glomerulonefritis membranoproliferativa, el síndrome de Sjögren y la porfiria cutánea tarda provocadas por procesos de autoinmunidad y por inmunocomplejos.
2. Queratoconjuntivitis seca, liquen plano, tiroiditis autoinmune, úlceras corneales de Mooren, fibrosis idiopática pulmonar y diabetes mellitus tipo 2.
3. Desórdenes linfoproliferativos.
4. Vasculitis crioglobulinémica con la aparición de úlceras en las piernas, asociadas con púrpura palpable en ausencia de dermatitis severa.
5. Disfunciones renales graves.
6. Neuropatías y parestesias dolorosas, siendo rara la afectación del sistema nervioso central.

El tratamiento actual de la hepatitis C consiste en la terapia conjunta con dos fármacos, el interferón pegilado alfa 2a o alfa 2b y la ribavirina¹⁸. El tratamiento tiene una duración entre seis y doce meses y se considera que ha tenido éxito cuando hay una respuesta vírica sostenida o carga vírica indetectable después de seis meses de acabar el tratamiento. En enfermos infectados crónicamente con el genotipo 1 de VHC el tratamiento tiene éxito en el 55% de los pacientes, y en enfermos infectados con los genotipos 2 y 3 el éxito del tratamiento se produce en el 80% de los casos. En el caso de portadores crónicos de la enfermedad con los genotipos 4, 5 y 6 de VHC no hay datos suficientes de éxito en el tratamiento, aunque se recomienda las mismas pautas de tratamiento que los enfermos con el genotipo 1 de VHC¹⁸.

I.1.1.4. Diagnóstico por el laboratorio.

Las técnicas empleadas en el diagnóstico de la infección por VHC incluyen pruebas serológicas basadas en la captura de anticuerpos anti-VHC y antígenos VHC mediante proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, así como técnicas NAT de detección del ARN del VHC en plasma humano^{19, 20}.

1. Detección de anticuerpos anti-VHC. Las pruebas serológicas que han

sido empleadas mayoritariamente son técnicas basadas en ELISA o enzimoimmunoanálisis (EIA) para la detección de anticuerpos anti-VHC. Hasta el momento actual se han desarrollado tres generaciones de reactivos (1ª, 2ª y 3ª generación) con los que se ha ido mejorando la especificidad y la sensibilidad de la prueba, añadiendo distintas proteínas recombinantes y péptidos sintéticos obtenidos a partir de diferentes partes estructurales y no estructurales del genoma del VHC, que se unen a distintos anticuerpos anti-VHC:

a. EIA 1ª generación: Proteína recombinante c100-3 que corresponde a la región NS4 del genoma VHC.

b. EIA 2ª generación: Dos proteínas recombinantes c100-3 y 5-1-1p de la región NS4, una proteína recombinante c33c de la región NS3 y la proteína recombinante c22-3 que corresponde a la región del core.

c. EIA 3ª generación: Proteínas recombinantes c100p, 5-1-1c, c33c, c22-3 y NS5, correspondiendo esta última a la región NS5 del genoma del VHC.

Estas pruebas se emplean no sólo con fines diagnósticos sino también como técnicas de cribado de las unidades de sangre procedentes de donantes de sangre.

Como pruebas serológicas de confirmación se han empleado distintas generaciones de enzimoimmunoanálisis en tira inmunoabsorbente (RIBA 1ª, 2ª y 3ª generación) las cuales contienen los mismos antígenos recombinantes que las técnicas ELISA. Las distintas generaciones han ido aumentando también la sensibilidad y la especificidad de la prueba.

2. Detección de antígenos VHC. Se han desarrollado pruebas serológicas de detección del antígeno del core del VHC por ELISA. En estas pruebas se utilizan anticuerpos monoclonales c11-10 y c11-14 que se unirán al antígeno del core del VHC²¹.

3. Detección de ARN-VHC^{22, 23-28}. Las pruebas de análisis de ácidos nucleicos (NAT) empleadas en el diagnóstico de la infección por VHC son las pruebas cualitativas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR): RT-PCR que utiliza un paso previo de retrotranscripción, la Nested-PCR o PCR anidada y la PCR a tiempo real. También se utilizan las pruebas NAT cualitativas basadas en amplificación mediada por la transcripción (TMA). Estas técnicas cualitativas NAT amplifican una zona conservada y específica del genoma del VHC. Desde 1999, las técnicas NAT se emplean en el cribado de las unidades de

sangre debido a que con su empleo se disminuye el periodo ventana en el que el virus está presente en el plasma pero no son detectables los anticuerpos anti-VHC. Estas técnicas NAT son, por tanto, más sensibles que las pruebas serológicas en la detección de unidades potencialmente capaces de transmitir la infección por VHC y pueden ser empleadas para detectar ARN-VHC en mezclas de unidades de sangre.

Las técnicas NAT cuantitativas Branched-DNA (ADN-ramificado), la RT-PCR cuantitativa, la PCR a tiempo real y la técnica NASBA (nucleic acid sequece based amplification) se emplean para monitorizar la respuesta al tratamiento con interferón y ribavirina. Estas técnicas cuantifican la cantidad de virus circulante por mL de plasma.

4. Otros métodos poco utilizados:

a) Detección de anticuerpos IgM¹⁴ anti-VHC de respuesta directa sobre el antígeno de la nucleocápside (core) como marcador directo en la fase aguda de la infección, donde es el único marcador junto a la detección del ARN-VHC.

b) Detección de anticuerpos IgG específica anti-VHC de baja avided^{29, 30}, único marcador capaz de identificar en forma específica la infección primaria aguda reciente por dicho virus.

c) Detección del ARN-VHC por PCR en el hígado¹⁴. Esta prueba podría ser el mejor marcador de recuperación o curación en la infección por VHC y explicaría los casos de viremia persistente, pero las condiciones óptimas de esta técnica no han sido establecidas hasta el momento actual.

d) Detección de antígenos VHC en hepatocitos por técnicas de inmunofluorescencia, mediante uso de anticuerpos monoclonales y policlonales, en casos de hepatitis C agudas y crónicas¹⁴. Estas técnicas han sido desarrolladas pero su uso clínico no ha sido posible. La sensibilidad y especificidad de estas pruebas no han sido evaluadas.

e) Detección de ARN-VHC en muestras de tejido hepático por técnicas de hibridación “in situ” por sondas no radiactivas¹⁴. Del mismo modo que las pruebas anteriores, su uso clínico no ha sido posible.

I.2. Medidas para reducir la transmisión del VHC por la sangre y hemoderivados.

Siguiendo la normativa española descrita en el Real Decreto 1088/2005³¹, los centros y servicios de transfusión deben cumplir unos requisitos técnicos y condiciones mínimas de calidad de las donaciones de sangre y los derivados sanguíneos, para garantizar la seguridad de todos los posibles receptores de hemoderivados. Por lo tanto se establecen unos criterios de selección y exclusión de donantes de sangre y se detallan los distintos análisis que se deben realizar a las donaciones de sangre junto a los criterios de interpretación de las pruebas para la detección de agentes infecciosos. Estos análisis se han ido adaptando a nuevos conocimientos científicos y condiciones técnicas en el campo de la medicina transfusional, como es la aparición de nuevas enfermedades transmisibles por transfusión.

I.2.1. Medidas previas a la donación adoptadas sobre el donante.

I.2.1.1. Selección del tipo de donación con respecto al donante: altruista frente a retribuida.

En 1975, siguiendo las recomendaciones de la OMS³² las donaciones de sangre en España empezaron a ser recolectadas exclusivamente de manera altruista, impulsadas en un primer momento por las Hermandades de Donantes de Sangre. Posteriormente, a partir del desarrollo de la Constitución Española en 1978, diferentes Reales Decretos y Órdenes fueron publicados para regular los requisitos técnicos y las condiciones mínimas de la hemodonación en los centros y servicios de transfusión. El último Real Decreto, 1088/2005, para garantizar la calidad y seguridad de la transfusión sanguínea, establece en el artículo 4 que las donaciones de sangre deben ser altruistas y voluntarias, definiendo a este tipo de donaciones como aquéllas en que la persona dona sangre, plasma o componentes celulares por su propia voluntad y no recibe ningún pago por ello, ya sea en efectivo o en alguna especie que pueda ser considerada como sustituto del dinero.

Los pequeños presentes como reconocimiento o el reembolso del desplazamiento son compatibles con la donación voluntaria no remunerada. El tiempo utilizado por el donante para este servicio es considerado como un deber de carácter público y personal. Por último se insta a las autoridades sanitarias competentes a fomentar la donación de sangre mediante programas de educación ciudadana sobre la donación de sangre y la dotación de la infraestructura sanitaria, los medios materiales, sanitarios y sociales para su organización y desarrollo, con el fin de llegar a la autosuficiencia nacional de productos sanguíneos. Por lo tanto en España no hay donaciones de sangre remuneradas ni se recolecta sangre por donantes de reposición, donde el paciente transfundido debe proporcionar los donantes de sangre. Sí está permitida la autotransfusión de componentes sanguíneos bajo prescripción médica.

La donación retribuida está prohibida y desaconsejada por ley en la mayoría de los países. Este tipo de donación está considerada peligrosa por diferentes motivos^{33, 34}:

1. Puede inducir al donante a ocultar datos de su salud que pueden comprometer al receptor y al mismo donante.
2. Muchos de estos donantes pueden proceder de grupos de población donde la prevalencia de determinadas enfermedades transmisibles es mayor.
3. Algunos de estos donantes pueden burlar el sistema de control de los centros de transfusión, donando sangre más veces de lo recomendado en perjuicio de su salud y de la calidad de la sangre.
4. Puede haber un aumento de la caducidad de las unidades de sangre recogidas por donación remunerada, debido a que el centro extractor pasa de ser un banco donde se custodia la sangre a ser el propietario de dicha sangre.

En Alemania y Estados Unidos está permitida la donación remunerada basándose en la necesidad de lograr el autoabastecimiento de productos sanguíneos. Estos países, en contra de las recomendaciones de organizaciones como la OMS, la Unión Europea y el Consejo de Europa, basan su política transfusional en que en su ámbito social la incidencia en la transmisión de enfermedades infecciosas por transfusión no es mayor a la de otros países donde la donación es exclusivamente altruista, aunque dichos países reconocen que la utilización de donaciones de sangre remuneradas sólo se puede realizar con seguridad en países desarrollados, donde el sistema económico y social esté bien

equilibrado³⁴.

La donación dirigida no remunerada, mediante donantes de reposición procedentes del entorno social o familiar del futuro receptor, es menos segura que la donación altruista, por lo que está desaconsejada. Además, en el caso de que el donante esté emparentado con el receptor, se requiere la irradiación de los componentes a transfundir a fin de prevenir la aparición de la enfermedad injerto contra el huésped postransfusional³³. En determinadas regiones de Italia y en Brasil está permitida la recolecta de sangre mediante donantes de reposición no remunerada, pero su uso está desaconsejado y está disminuyendo progresivamente³⁴.

I.2.1.2. Selección del donante.

La legislación española ha establecido los criterios y condiciones de selección y exclusión de donantes de sangre adaptándose a los nuevos conocimientos científicos y a las recomendaciones realizadas por la Comisión Nacional de Hemoterapia y los organismos internacionales competentes. Así en el último Real Decreto 1088/2005 se detallan todos los requisitos y acciones sobre el donante de sangre³¹. Estas acciones que se realizan sobre el donante de sangre para su selección se revisan y actualizan periódicamente y son las siguientes:

- 1.** Información al donante por escrito explicándole en qué consiste la donación de sangre, el fraccionamiento de la sangre en los diferentes derivados sanguíneos y su beneficio para el receptor. También se le informa por escrito de las actividades que excluyen de la donación y de la importancia de la autoexclusión (no donar sangre) si le son aplicables algunas de ellas. Se le informa también de que su sangre se analizará para distintos marcadores infecciosos y se le notificarán los resultados, siendo excluido como donante ante un resultado positivo. Se le solicitará que notifique cualquier complicación o enfermedad posterior que pueda convertir la donación como inadecuada para la transfusión.

- 2.** Información del donante antes de la donación por personal sanitario debidamente formado, sobre su identificación y sobre los factores que puedan

descartar o desaconsejar la donación por el riesgo para la salud del receptor o el mismo donante.

3. El centro de transfusión garantizará al donante de la confidencialidad respecto a sus datos, a la analítica de su donación y a la trazabilidad futura de la donación, de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999. Los centros de transfusión informarán adecuadamente al donante y adoptarán medidas de seguridad en el tratamiento de los datos, según el Real Decreto 994/1999. Los donantes de sangre podrán disponer de sus datos personales del sistema de registro de los centros de transfusión y la utilización de sus datos tendrá carácter asistencial o en interés de la salud pública y obligará a los que los utilizaran a respetar la intimidad y la vida privada.

4. Aplicación de los criterios de selección de donantes de sangre donde se estudiarán:

a. Edad del donante: De 18 a 65 años, pudiendo ser mayores de 65 años con permiso médico anual.

b. Peso corporal del donante: Debe ser mayor de 50 Kg.

c. Pulso y presión arterial: Dentro de los límites adecuados para la extracción.

d. Nivel de hemoglobina: En mujeres debe ser mayor o igual a 125 g/L y en hombres debe ser mayor de 135 g/L, pudiendo ser aceptados por debajo de estos niveles bajo responsabilidad médica.

e. Nivel de proteínas totales en donantes de plasmaféresis: Superior o igual a 60 g/L.

f. Nivel plaquetario en donantes de aféresis: Superior o igual a $150 \times 10^9/L$

g. El intervalo mínimo entre dos extracciones consecutivas de sangre total no podrá ser inferior a dos meses, siendo el número máximo de extracciones anuales de cuatro para hombres y de tres para mujeres.

h. La cantidad de sangre extraída en cada ocasión deberá tener en cuenta el peso del donante y no deberá superar el 13 % del volumen sanguíneo teórico del donante.

I.2.1.3. Autoexclusión confidencial del donante.

En la información confidencial del donante de sangre previa a la donación se da mucha importancia a la autoexclusión, los motivos de exclusión y a las razones por las que no se puede donar sangre en los casos que exista peligro para el receptor o para el donante. Por ello aparte de la exploración física en la selección de los donantes, se realiza un cuestionario por personal sanitario autorizado para conocer los factores de riesgo de cada donante que puedan hacer que su donación sea peligrosa para el receptor o para el mismo donante, basándose en unos criterios de exclusión que pueden ser temporales o permanentes.

a. Los criterios de exclusión permanentes están dirigidos a donantes homólogos con:

1. Enfermedades cardiovasculares, excepto anomalías congénitas curadas.
2. Enfermedades del sistema nervioso central graves.
3. Coagulopatías hemorrágicas.
4. Episodios repetidos de síncope o antecedentes de convulsiones.
5. Enfermedades gastrointestinales, genitourinarias, hematológicas, inmunológicas, renales o respiratorias graves, activas, crónicas o recidivantes.
6. Diabetes que precisa insulina.
7. Hipertensión arterial grave.
8. Enfermedades infecciosas: Padecer o haber padecido hepatitis B (excepto las personas negativas al antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), cuya inmunidad haya sido demostrada) hepatitis C, síndrome de inmunodeficiencia adquirida o ser portador de anticuerpos anti-VIH 1/2, infección por HTLV 1/2 o ser portador de anticuerpos frente al mismo, babeosis, kala-azar (leishmaniosis visceral), enfermedad de Chagas (los donantes nacidos o hijos de madres nacidas o que han sido transfundidos en las zonas donde la enfermedad es endémica, pueden ser aceptados si una prueba validada dirigida a la detección de portadores de la enfermedad es negativa).
9. Cáncer (excepto completa recuperación de un tumor localizado).
10. Encefalopatías espongiiformes transmisibles, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la variante de esta enfermedad (personas con antecedentes familiares o

sometidas a trasplante de córnea o de duramadre o que hayan sido tratadas con medicamentos derivados de glándula pituitaria humana y las personas que hayan estado más de 12 meses en el Reino Unido en el periodo 1980-1996).

11. Consumo de drogas por vía intravenosa o muscular no prescritas.

12. Personas trasplantadas de cualquier órgano.

13. Personas con conducta sexual que suponga un riesgo elevado de contraer enfermedades infecciosas graves transmisibles por transfusión sanguínea.

14. Personas transfundidas en el Reino Unido y en países donde son endémicos: Paludismo, Sida, infección por HTLV y enfermedad de Chagas.

b. Los criterios de exclusión temporal para donantes homólogos son los siguientes:

1. Después de sufrir una enfermedad infecciosa, se excluye al donante durante dos semanas tras el restablecimiento completo de dicha enfermedad, excepto:

1.1. En determinadas infecciones donde la exclusión es de dos años: Brucelosis, osteomielitis, fiebre Q, tuberculosis, fiebre reumática (excepto si existen pruebas de afectación cardiaca crónica).

1.2. Sífilis, donde la exclusión es de un año.

1.3. Fiebre superior a 38 °C y afecciones pseudogripales: la exclusión es de dos semanas.

1.4. Paludismo:

1.4.1. Se excluirán durante tres años a personas nacidas en zonas endémicas tras el regreso de su última visita, si no presentan síntomas. Pueden ser readmitidas tras cuatro meses si una prueba inmunológica o genómica validada para el diagnóstico de paludismo es negativa.

1.4.2. También se excluirán durante los tres años posteriores al tratamiento a personas con antecedentes de paludismo sin síntomas. Se pueden readmitir como donantes si una prueba validada para el diagnóstico es negativa.

1.4.3. Se excluirán durante seis meses a las personas asintomáticas que hayan viajado a zonas endémicas, tras el abandono de las mismas. Se pueden readmitir como donantes si una prueba validada para el diagnóstico es negativa.

1.4.4. Se excluirán durante tres años a las personas con antecedentes de afección febril durante la estancia en las zonas endémicas o en los seis meses

posteriores a su abandono. También pueden ser readmitidas como donantes después de cuatro meses si una prueba validada para el diagnóstico es negativa.

1.5. Virus del Nilo Occidental: La exclusión es de 28 días tras abandonar una zona en la que se detectan casos de infección en humanos.

1.6. Después de una intervención o exposición de riesgo de contraer una enfermedad infecciosa transmisible por transfusión:

1.6.1. Tras una endoscopia con instrumental flexible, salpicadura de sangre a mucosa o lesión con aguja, transfusión de componentes sanguíneos, trasplante de tejidos o células de origen humano, cirugía mayor, tatuaje o perforaciones de piel o mucosas, acupuntura salvo la realizada con agujas desechables, personas con contacto directo doméstico o relación sexual con personas afectadas por hepatitis B, la exclusión será de seis meses o de cuatro meses si la prueba NAT para la detección del ARN-VHC es negativa.

1.6.2. Tras el cese de la actividad de riesgo en grupos de riesgo, el tiempo de exclusión vendrá dado por la disponibilidad de pruebas de diagnóstico de cada enfermedad y por la enfermedad en cuestión.

1.7. Tras una vacunación con virus o bacterias atenuados la exclusión es de cuatro semanas y si la vacunación contra la rabia se administra tras la exposición, la exclusión es de un año.

1.8. Otras exclusiones temporales pueden ser: por embarazo o interrupción del mismo (seis meses tras el parto o finalización); por cirugía menor (una semana); medicación (la exclusión dependerá de la naturaleza del medicamento, de su modo de acción y de la enfermedad a la que va dirigido)

1.9. Situaciones epidemiológicas concretas: el periodo de exclusión dependerá del tipo de enfermedad.

I.2.1.4. Donación autóloga y autotransfusión.

La donación autóloga consiste en la extracción de sangre o de sus componentes para ser transfundidos exclusivamente a la misma persona.

Las autotransfusiones en que se emplea sangre y componentes sanguíneos depositados previamente mediante donación autóloga sólo se realizarán mediante prescripción médica. A los donantes autólogos se les informará previamente a la

donación, como en el caso de las donaciones homólogas, de la posibilidad de la exclusión y de las razones por las que el procedimiento no se llevará a cabo si existe riesgo para la salud. También se les informará de la posibilidad de que la sangre autóloga o sus componentes no sean suficientes para las necesidades previstas y de que la sangre autóloga y demás componentes no utilizados sean descartados y no transfundidos a otros pacientes.

Los criterios de exclusión permanente y temporal para las donaciones autólogas difieren de los utilizados para las donaciones homólogas.

Así los criterios de exclusión permanente para las donaciones autólogas son los siguientes³¹:

1. Enfermedad cardíaca grave, dependiendo de las circunstancias clínicas en el momento de la extracción sanguínea.
2. Personas con antecedentes de infección por hepatitis B (excepto las personas con el antígeno de superficie de la hepatitis B negativo, cuya inmunidad haya sido demostrada) por hepatitis C, por VIH y por HTLV 1 / 2.

El único criterio de exclusión temporal para las donaciones autólogas es una infección bacteriana activa.

Otras consideraciones sobre la donación autóloga son que la sangre y los componentes autólogos deberán identificarse y etiquetarse como tales y deberán ser conservados, transportados y distribuidos de forma separada de la sangre y componentes homólogos, para impedir la transfusión a otros pacientes. Los componentes autólogos no transfundidos no se utilizarán para transfusión homóloga ni para fraccionamiento. A las donaciones autólogas se les realizarán las mismas pruebas analíticas que a las donaciones homólogas.

Según distintos estudios, las principales ventajas de la utilización de sangre autóloga son³⁵:

1. Evitar efectos adversos de la transfusión de sangre homóloga de tipo inmunológico (reacción hemolítica, reacción febril o alérgica, anafilaxia, síndrome de distrés respiratorio del adulto, enfermedad injerto contra huésped, aloinmunización, púrpura post-transfusional).
2. Evitar la transmisión de enfermedades víricas transmitidas por transfusión (SIDA, Hepatitis C, Hepatitis B) aunque actualmente la seguridad transfusional ha aumentado mucho.
3. Evitar las consecuencias de la inmunomodulación inducida por la

transfusión homóloga, es decir aumento de infecciones postoperatorias, aumento de recidivas tumorales y disminución de la supervivencia³⁶.

4. Ahorro de sangre homóloga, evitando así situaciones de desabastecimiento.

5. Respeto de las preferencias o creencias del paciente (Testigos de Jehová).

I.2.2. Medidas posteriores a la donación con respecto al donante: pruebas de laboratorio.

Las pruebas de laboratorio que se realizan a las donaciones de sangre para el cribado de los distintos agentes transmisibles se dividen en pruebas serológicas y pruebas NAT.

Con las pruebas serológicas se detectan los distintos anticuerpos y/o antígenos frente a los diferentes patógenos:

1. VIH1/2: anticuerpos y/o antígenos frente a VIH1/VIH2.
2. VHC: anticuerpos y/o antígenos frente a VHC
3. VHB: anticuerpos y/o antígenos frente a VHB (antígeno de superficie, antígeno-e, anticuerpo-core, anticuerpo-e y anticuerpo de superficie)
4. *Treponema pallidum* (causante de Sífilis): Reaginas plasmáticas como marcador indirecto de Sífilis y anticuerpos frente al *Treponema pallidum*.
5. *Tripanosoma cruzi* que provoca la Enfermedad de Chagas: anticuerpos frente al *Tripanosoma cruzi*.

Con las pruebas NAT detectaremos los ácidos nucleicos (ARN, ADN) de los diferentes patógenos:

1. VIH1 : ARN-VIH1
2. VHC: ARN-VHC
3. VHB: ADN-VHB

I.2.2.1. Pruebas serológicas de cribado y marcadores indirectos. Anticuerpos frente a VHC y antígeno del mismo.

En 1989 se identificó el VHC por científicos colaboradores con la empresa Chiron Corporation y los centros de control de enfermedades¹¹. Pronto se obtuvieron proteínas recombinantes para la detección de anticuerpos anti-VHC y se desarrollaron las primeras técnicas de detección¹². Las pruebas serológicas de cribado tienen una buena sensibilidad pero son poco específicas en poblaciones de prevalencia baja por lo que todos los resultados inicialmente positivos deben ser repetidos.

Podemos clasificar las pruebas serológicas para la detección del VHC en técnicas para la detección de anticuerpos anti-VHC y técnicas de detección de antígenos VHC.

1. Técnicas de detección de anticuerpos anti-VHC:

1.1. Radioinmunoanálisis (RIA): Consiste en la unión de los anticuerpos anti-VHC a antígenos recombinantes marcados y la detección de estos complejos formados por exposición a una película de Rayos X³⁷. Las pruebas de primera generación contenían la proteína recombinante 5-1-1 derivada de la región NS4 del genoma del virus de la hepatitis C y su reactividad se relacionó con algunos casos de hepatitis no A-no B, que presentaban concentraciones de ALT elevadas o presentaban anticuerpos anti-VHB-core. Posteriormente se empleó el antígeno c-100, derivado de la región NS4 del genoma del VHC, que resultó ser más sensible y específico que el anterior³⁷⁻³⁹.

1.2. EIA: Los anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra problema son capaces de unirse a distintas proteínas recombinantes específicas; estos complejos antígeno-anticuerpo son detectados por la adición de una inmunoglobulina específica marcada con un conjugado enzimático que se unirá al anticuerpo del complejo. Finalmente, el enzima unido catalizará una reacción colorimétrica o de emisión de fotones por la adición de un compuesto cromógeno o quimioluminiscente, respectivamente. La detección se realizará mediante un espectrofotómetro, en el primer caso, o un contador, en el segundo⁴⁰.

Podemos distinguir tres tipos de EIA según su aparición cronológica:

1.2.1. EIA de 1ª generación (1989-1990): Utilizaban las proteínas recombinantes c-100, pero tenían una baja sensibilidad en muestras definidas clínicamente como hepatitis no-A no-B, y sólo daban resultados positivos semanas después de desarrollar síntomas clínicos³⁸. La especificidad también resultó baja³⁹⁻⁴¹ y daba un alto porcentaje de falsos positivos⁴⁴⁻⁴⁶.

1.2.2. EIA de 2ª generación (1991-1992): Se desarrollaron antígenos recombinantes estructurales c22 de la región del core y no estructurales como c33 de la región NS3 del genoma del VHC y se añadieron al antígeno c100 utilizado en las pruebas de 1ª generación⁴⁷. La introducción de los nuevos antígenos recombinantes aumentó la sensibilidad y la especificidad de la técnica, aclarando discrepancias clínicas y analíticas que tuvieron lugar con las pruebas de 1ª generación⁴⁸. El aumento de sensibilidad se debió a que los antígenos recombinantes añadidos son los primeros en provocar una respuesta de anticuerpos conocida y, por lo tanto, dan resultados positivos en fases precoces de la infección⁴⁹. Otros EIA de 2ª generación utilizaron péptidos sintéticos derivados de las regiones del core, NS4 y NS3 del VHC, mejorando la especificidad pero empeorando la sensibilidad⁵⁰, debido a que estos péptidos sintéticos no contenían las impurezas potencialmente reactivas de las proteínas recombinantes pero con el inconveniente de que dichas proteínas sintéticas, derivadas de una secuencia modelo del genoma del VHC, presentaban diferencias con los antígenos naturales del virus de la hepatitis C.

1.2.3. EIA de 3ª generación (a partir de 1993): Se añadió una porción recombinante derivada de la región NS5 del genoma del VHC a los antígenos presentes en los EIA de 2ª generación. En algunas pruebas los antígenos NS3 y NS4 se fusionaron en una proteína c200. Estos cambios no mejoraron la sensibilidad de detección de anticuerpos anti-VHC pero mejoraron la detección de la región NS3^{51, 52}. La introducción de la proteína NS5 redujo la especificidad aumentando los falsos positivos⁵³.

1.3. Pruebas de detección de otras inmunoglobulinas G (IgG): El VHC es relativamente poco inmunógeno y puede presentar bajos niveles de anticuerpos de la región conservada N-terminal durante periodos prolongados. Esta región N-terminal del VHC contiene otra región hipervariable (HVR 1 y 2) que codifica para la glicoproteína E2 que tiene una alta variabilidad de antígenos. Los

anticuerpos anti-E2 pueden detectarse tanto en las fases iniciales de la infección por VHC como en las fases tardías, por lo que la adición del antígeno E2 junto a los demás antígenos VHC en las pruebas serológicas de cribado podría mejorar la detección de anticuerpos anti-VHC durante la seroconversión⁵⁴. La determinación de anticuerpos anti-E2 ha sido útil para el estudio de casos con la prueba de confirmación serológica con resultado indeterminado, detectándose en la fase aguda de infección durante seroconversión y en la fase crónica o de resolución de la infección en los que la únicos anticuerpos anti-VHC detectados han sido los anticuerpos del core (C22c)⁵⁵. Sin embargo, el alto coste de este antígeno recombinante E2 y el bajo nivel de expresión de la molécula recombinante respecto a la proteína natural, explican la ausencia de pruebas de cribado con este antígeno¹⁹.

1.4. Detección de anticuerpos anti-VHC de clase IgA e IgM.

Estudios en donaciones de sangre han demostrado que los anticuerpos anti-VHC de clase IgM tienen una prevalencia tres veces menor que la de clase IgG¹⁹, aunque su determinación es útil en el estudio de hepatitis C agudas⁴⁹.

Los anticuerpos de clase IgA pueden no ser detectados en enfermos crónicos, por lo tanto, su determinación no se utiliza en el cribado de donaciones de sangre¹⁹.

1.5. Detección de IgG específica anti-VHC de baja avidéz, útil para identificar la infección primaria aguda reciente por VHC con fines de diagnóstico y en el estudio de brotes epidémicos^{29, 30}.

2. Técnicas de detección de antígenos VHC:

2.1. EIA de 1ª generación: Es un EIA tipo sandwich sobre una microplaca cuyos pocillos están recubiertos con anticuerpos monoclonales c11-3 y c11-7 dirigidos contra el antígeno del core de VHC²¹.

En un primer paso el diluyente de muestra rompe las partículas víricas, para liberar el antígeno del core del VHC, e inactiva los posibles anticuerpos frente al core del VHC que pueden estar presentes en la muestra y, por tanto, interferir en el desarrollo de la técnica, favoreciendo así la unión de los antígenos del core a los anticuerpos presentes en los pocillos de la microplaca.

En un segundo paso se utilizan anticuerpos monoclonales c11-10 y c11-14 conjugados con peroxidasa que por la adición de un cromógeno en medio ácido dará un color cuya absorbancia a 492 nm (A_{492nm}) se leerá en un

espectrofotómetro²¹. Las pruebas positivas se confirman mediante una prueba de neutralización del antígeno de VHC con su anticuerpo correspondiente. Si las muestras contienen antígeno, al añadirle el anticuerpo habrá una neutralización entre ellos y la absorbancia será menor. La reducción de la absorbancia es directamente proporcional al porcentaje de neutralización. Se considera confirmada la presencia de antígeno de VHC en una muestra si el porcentaje de neutralización es superior al 50%.

La especificidad de la prueba de detección del antígeno de VHC es similar a la mayoría de las pruebas ELISA de detección de anticuerpos anti-VHC y la introducción de esta técnica en los centros de transfusión es viable y ha sido probada⁵⁶. Estas pruebas de detección del antígeno del core del VHC disminuyen el periodo ventana y reducen el riesgo de transmisión de VHC por transfusión comparado con las demás pruebas serológicas de detección de anticuerpos anti-VHC^{21, 57}.

La sensibilidad y la especificidad de las técnicas de detección del antígeno del core del VHC es inferior a las pruebas de detección de ARN-VHC^{58, 59}, por este motivo en España son obligatorias las pruebas NAT de detección del ARN-VHC y no las pruebas de detección del antígeno VHC³¹.

2.2. EIA de 2ª generación: Es una técnica de detección y cuantificación del antígeno del core del VHC que presenta dos mejoras respecto a las pruebas de 1ª generación⁶⁰. La primera es la detección de antígeno en presencia de anticuerpos específicos con la introducción de un tratamiento previo de disociación de inmunocomplejos (ag-VHC-anti-VHC). La segunda mejora es el aumento de sensibilidad analítica para el cribado de donantes de sangre mediante la mejora del conjugado para obtener una amplificación de señal superior a las pruebas de la versión anterior. Estas modificaciones hacen que tenga una sensibilidad y una especificidad superior a la prueba de detección del antígeno de 1ª generación pero sigue siendo menos sensible y específica que las pruebas de detección del ARN-VHC^{59, 60}.

En el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana se emplean las siguientes pruebas serológicas de cribado de las donaciones de sangre:

1. EIA de 1ª generación para la detección de anticuerpos anti-VHC (EIA 1.0 ORTHO Diagnostics. Raritan N.J). Esta técnica se utilizó desde enero de 1990 hasta agosto de 1991. La fase sólida consiste en pocillos revestidos de

antígenos VHC en microplaca. La fase sólida está recubierta del antígeno recombinante c100-3 derivado del gen NS4.

En una primera etapa, se incuba la muestra inicial de suero con la fase sólida con los antígenos recombinantes del VHC; los anticuerpos VHC se unen a los antígenos recombinantes (complejo antígeno-anticuerpo).

En una segunda etapa se añade el conjugado, que consiste en anticuerpos complementarios marcados con enzimas (peroxidasa de rábano picante) que se unen a la porción de la IgG humana de los complejos antígeno-anticuerpo, y que son capaces de actuar sobre un sustrato cromogénico.

En una tercera etapa se añade al pocillo un sustrato cromogénico que consiste en o-fenilendiamina (OPD) y peróxido de hidrógeno. Si hay conjugado unido el OPD se oxidará dando lugar a un producto final coloreado. En esta reacción la peroxidasa se oxida de forma divalente mediante el peróxido de hidrógeno y forma un compuesto intermedio que, a su vez, se reduce a su estado inicial mediante interacción subsiguiente con el OPD donador de ión hidrógeno.

La reacción se paraliza al añadir ácido sulfúrico. La intensidad de color depende de la cantidad de conjugado y, por tanto, de la concentración de anticuerpos anti-VHC en la muestra. La intensidad de color se mide con un fotómetro a una longitud de onda adecuada (492 nm). Los resultados vienen dados por la relación S/CO , donde S es la densidad óptica de la muestra a 492 nm y CO es la densidad óptica del punto de corte a 492 nm. El valor de CO viene dado por una calibración efectuada en la misma serie de muestras. El resultado es positivo cuando la relación $S/CO \geq 1$, y es negativo cuando esta relación $S/CO < 1$.

Con esta técnica se analizaban por duplicado todas las unidades de sangre, una primera vez en determinación individual y una segunda vez en mezclas de 10 unidades. Esta técnica estaba semiautomatizada mediante la utilización de aparatos dispensadores de muestras y reactivos.

2. EIA de 2ª generación (EIA 2.0 ORTHO Diagnostics. Raritan N.J y EIA 2.0 ABBOTT). Estas técnicas se utilizaron entre septiembre de 1991 y mayo de 1993. La fase sólida consistía en pocillos revestidos de antígenos VHC en microplaca en el caso de la técnica de ORTHO y de esferas de poliestireno en el caso de la técnica de ABBOTT. La fase sólida contenía la proteína c33c de la región NS3, la proteína c22-3 de la región core y la proteína c200 de las regiones NS3 y NS4 del genoma viral del VHC. Las diferentes etapas de la técnica e

interpretación de los resultados no varían con respecto a las del EIA de 1ª generación. La técnica EIA 2.0 ORTHO normalmente, se utilizaba para el análisis individual de las unidades de sangre y con la técnica EIA 2.0 ABBOTT se analizaban las mezclas de 10 unidades de sangre.

3. EIA de 3ª generación (EIA 3.0 ORTHO Diagnostics Raritan N.J y EIA 3.0 ABBOTT). Esta técnica se empezó a utilizar en junio de 1993. En esta técnica, la fase sólida contenía la proteína c33c de la región NS3, la proteína c22-3 de la región core y la proteína c200 de las regiones NS3 y NS4 del genoma del VHC de las versiones anteriores; modificaba la proteína NS3 para mejorar la sensibilidad y añadía la región genómica NS5. La fase sólida consiste en micropocillos recubiertos de antígenos recombinantes codificados del VHC en el caso de la técnica de ORTHO y en las esferas de poliestireno en caso de la técnica de ABBOTT. Las diferentes etapas de la técnica e interpretación de los resultados no varían respecto a versiones anteriores. Al introducir la técnica de inmunoanálisis por quimioluminiscencia (ChLIA) (ABBOTT PRISM HCV), la prueba EIA ORTHO 3.0 se utilizó normalmente para el cribado de las donaciones de sangre en mezclas de 10 unidades en el Centro de Transfusión de Valencia.

4. Inmunoanálisis por quimioluminiscencia (ChLIA) (ABBOTT PRISM HCV). Es un ChLIA de 3ª generación en un sistema totalmente automatizado (PRISM). La fase sólida consiste en micropartículas recubiertas de la proteína c100-3 derivada de las regiones NS3 y NS4, de la proteína derivada de la región genómica NS5 y de la proteína HCr43 derivada de las regiones genómicas del core y NS3. Esta técnica se empezó a utilizar en 1996 y se sigue utilizando en la actualidad. Se ha empleado siempre como técnica de cribado de donaciones de sangre individuales.

Esta técnica consta de cuatro etapas:

1ª etapa: Unión de los anticuerpos anti-VHC presentes en suero o plasma a los antígenos recombinantes de las micropartículas en los pocillos de incubación de la placa de reacción.

2ª etapa: Después de la primera incubación, se transfiere la mezcla de reacción a una matriz de fibra de vidrio. Las micropartículas son capturadas por la matriz mientras el resto de la incubación pasa por el papel secante de la placa de reacción.

3ª etapa: Adición de un conjugado que consiste en anticuerpos marcados

con biotina y acridina que se unen a las IgG humanas (anticuerpos anti-VHC) que a su vez, están unidas a las micropartículas.

4ª etapa: Adición de una solución alcalina que contiene peróxido de hidrógeno que desencadena una reacción química que produce una señal quimioluminiscente o emisión de fotones que son medidos por un fotómetro. La cantidad de luz emitida es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-VHC presentes en la muestra. La presencia o ausencia de anticuerpos anti-VHC en la muestra se determina comparando el número de fotones emitidos con el valor del punto de corte (S/CO), obtenido mediante una calibración efectuada durante la misma serie de muestras. La interpretación de los resultados es la siguiente: $S/CO < 0.8$ muestra negativa; $0.8 \leq S/CO < 1$ muestra dudosa o en zona gris (se considera como positiva); $S/CO \geq 1$ muestra positiva.

5. EIA de 3ª generación (AXSYM HCV 3.0 ABBOTT Científica). Esta técnica se está empleando desde 1997, como técnica para la detección de anticuerpos anti-VHC en las unidades de sangre que han dado positivo en la prueba de cribado. Con esta técnica se repite una segunda alícuota de la misma extracción (buffy-coat) de la unidad de sangre que da positivo por primera vez en la prueba de cribado. Es un EIA en fase sólida, que utiliza micropartículas recubiertas de antígenos recombinantes VHC: La proteína HCr43 derivada de la región genómica del VHC del core y NS3, la proteína c100 y la proteína c200 derivadas de la región genómica NS3 y NS4 y la proteína derivada de la región NS5.

La prueba está automatizada en el aparato AXSYM de Abbott Científica y consta de cuatro etapas:

1ª etapa: Unión de los anticuerpos anti-VHC presentes en el suero con las micropartículas recubiertas de antígenos VHC.

2ª etapa: Unión de las micropartículas a unos pocillos de fibra de vidrio.

3ª etapa: Adición de un conjugado frente a las IgG humanas marcado con fosfatasa alcalina que se unirá al complejo antígeno- anticuerpo durante una incubación.

4ª etapa: Adición de un sustrato con propiedades de fluorescencia (4-metilumbeliferil fosfato). El conjugado marcado con fosfatasa alcalina cataliza la disociación del grupo fosfato del sustrato, formándose un producto fluorescente cuya fluorescencia se mide con un sistema óptico. La presencia o ausencia de

anticuerpos anti-VHC se determina comparando la tasa de formación de producto fluorescente con la tasa del punto de corte, que se calcula a partir de una calibración anterior. La interpretación de resultados es el siguiente: Positivo: $S/CO \geq 1$, negativo $S/CO < 1$.

I.2.2.2. Determinación de la concentración de actividad de ALT.

La medición de la concentración de la actividad de la ALT es un indicador de daño hepático. En 1986 se introdujo la determinación concentración de la actividad de la ALT junto a la determinación de los anticuerpos anti-VHB core en los bancos de sangre de los Estados Unidos para reducir el riesgo de infección de la hepatitis no A no B (hepatitis C) por transfusión. El descubrimiento del VHC como causante de la hepatitis no A no B confirmó la importancia de la determinación de la ALT y anticuerpos anti-VHB core en relación a la determinación de la hepatitis C, ya que el 50 % de los donantes con anticuerpos anti-VHC de 1ª generación positivos eran también positivos para uno de los dos marcadores secundarios utilizados para reducir el riesgo de infección por VHC. Posteriores estudios comparativos entre marcadores directos de la hepatitis C (anticuerpos anti-VHC de 2ª y 3ª generación) y marcadores indirectos (ALT, anticuerpos anti-VHB core) han confirmado la irrelevancia de estos últimos frente a los primeros. Otros estudios han demostrado que la mayoría las donaciones de sangre con la ALT elevada o con anticuerpos anti-VHB core positivos eran negativas frente a anticuerpos anti-VHC y HBsAg, y también eran negativas por técnicas de amplificación genómica del ARN-VHC y ADN-VHB. Sin embargo la determinación de la ALT en los donantes de sangre se ha seguido realizando basándose en las siguientes premisas:

1. La ALT pueden estar alteradas en el periodo ventana de las infecciones por VHB y VHC.

2. Algunas personas con infección activa por VHC y VHB, que no son detectados por pruebas serológicas, tienen alterada la ALT.

3. La existencia de otras hepatitis víricas que provocan una alteración en la concentración de ALT y que no son detectadas por las pruebas de cribado⁶¹.

El estudio del valor de la determinación de ALT en el cálculo de los

periodos ventana de infecciones por VHC y por VHB, el análisis de coste/efectividad de la prueba de determinación de ALT y la introducción de las pruebas NAT para la detección del ARN-VHC y del ADN-VHB como pruebas de cribado de las donaciones de sangre, disminuyendo el periodo ventana de ambas infecciones, ha anulado el valor de la determinación de ALT^{61, 62}. Por otra parte, otros estudios han demostrado que hay determinados virus transmisibles por transfusión que no se detectan en el cribado de las donaciones de sangre, como son CMV, EBV, VHA o parvovirus B19, los cuales no se detectan más frecuentemente en donantes de sangre con ALT alterada⁶³.

El valor de corte a partir del cual la contracción de ALT se considera alterada en donantes de sangre no está establecido y determinados factores no infecciosos pueden variar la concentración de ALT⁶⁴. Estos factores pueden ser los instrumentos utilizados para su medida, los reactivos empleados y determinadas características del donante de sangre como la edad, sexo, obesidad, la ingesta de alcohol, determinados medicamentos de uso común y por razones extrahepáticas (musculares, renales y de células sanguíneas)^{63, 64}. Por este motivo se recomienda que cada laboratorio determine el valor de corte en su población de donantes de sangre mediante estudios estadísticos y así desechar el mínimo de donaciones de sangre que realmente no son infecciosas^{64, 65}.

En España y en la mayoría de los demás países la determinación de la concentración de ALT en donantes de sangre no ha sido obligatoria por ley³¹, sin embargo la industria fraccionadora de derivados del plasma, ante la falta de consenso en los distintos países para la determinación de ALT en las donaciones de sangre y para conseguir una estandarización de los derivados plasmáticos, ha exigido este análisis para todo el plasma que se destine a su fraccionamiento⁶⁶.

En julio de 2006 la Agencia Española del Medicamento, basándose en las recomendaciones de la Agencia Europea del Medicamento (CPMP), en el documento CPMP/BWP/269/95 rev. 3, autorizó a la industria fraccionadora a dejar de exigir este análisis para todo el plasma destinado a elaborar hemoderivados⁶⁷.

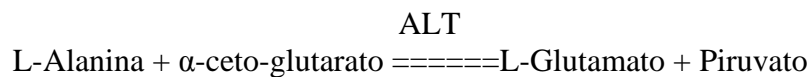
Las técnicas de análisis de la concentración de la ALT en suero o plasma utilizan métodos colorimétricos, cromatográficos y fluorescentes, los cuales eran poco específicos y no prácticos en un laboratorio clínico. Posteriormente, mediante una técnica indirecta recomendada por la Federación Internacional de

Química Clínica la concentración de ALT se determina indirectamente ya que las ALT catalizan la transferencia del grupo amino de la alanina a α -ceto-glutarato dando como resultado los dos productos glutamato y piruvato.

Las técnicas de análisis de la concentración de la actividad de ALT empleadas en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana son las siguientes:

1. Prueba A-Gent SGTP-Activated de ABBOTT. Es una técnica que mide cuantitativamente la ALT en suero. La mezcla de reactivos que emplea esta técnica es:

L-Alanina, NADH, α -ceto-glutarato, lactato deshidrogenasa (LDH) y piridoxal-5-fosfato (PLP). La enzima ALT cataliza la transaminación de alanina y del α -cetoglutarato para producir piruvato y glutamato:



El piruvato formado en la reacción se mide mediante una segunda reacción en la que interviene la enzima LDH:



Debido a que el NADH absorbe la luz a 340 nm y el NAD^+ no, el índice de disminución de la absorbancia a 340 nm es proporcional a la actividad de la ALT en la muestra.

La velocidad de reacción se mide después de un periodo de 5 minutos para permitir que el piruvato endógeno en suero sea consumido y dejar que la posible apoenzima inactivada de SGOT sea totalmente activada por combinación con su coenzima específica PLP.

Esta técnica puede utilizar como instrumentos medidores, los analizadores bicromáticos ABBOTT ABA-200 con filtro 340/380 nm, los cuales deben ser calibrados según protocolos, para obtener el factor de calibración.

La técnica consta de cuatro etapas:

- 1.** Dispensación de 3 mL del reactivo e incubación a 37°C durante 5 minutos.
- 2.** Adición de 300 μL de la muestra de suero al reactivo e incubar a 37°C.
- 3.** Medición de la absorbancia a 340 nm a los 5 minutos.
- 4.** Medición de la absorbancia a 340 nm a los 10 minutos.

Los resultados se miden en U/L, donde U es la cantidad de actividad enzimática que convertirá el sustrato a producto a la velocidad de 1 micromol por minuto. Las actividades de ALT expresadas en U/L por el método manual, se calculan con la fórmula:

$$U/L = ((A1-A2)/5 \text{ min}) \times (3.3 \text{ mL}/0.3 \text{ mL}) \times (1000/6,22) = (A1-A2) \times 354;$$

Donde:

A1: lectura de absorción a los 5 minutos

A2: lectura de absorción a los 10 minutos

5 min: Intervalo de tiempo entre lecturas

3,3 mL: volumen final

0,3 mL: volumen de muestra

6,22: coeficiente de extinción milimolar de NADH a 340 nm

1000: conversión de U/mL a U/L

El valor de corte entre las muestras normales y muestras con ALT alteradas ha ido variando, así entre 1990 y 1999 este valor de corte se estableció en 65 U/L.

Esta técnica se empleó hasta el año 1999 cuando fue sustituida por la técnica de determinación de la concentración de ALT de ABBOTT, automatizada en el analizador ALCYON 300/300i.

2. Técnica de determinación de la concentración de ALT de ABBOTT. En 1999 se empezó a utilizar esta técnica y se dejó de utilizar en julio de 2007.

Los fundamentos de esta técnica son idénticos a la prueba A-Gent SGTP-Activated de ABBOTT, salvo que está automatizada en el analizador ALCYON y en que no utiliza la enzima PLP. El analizador debe ser calibrado para disponer de un factor de calibración que permita obtener los valores reales en las muestras analizadas. El índice de reacción se mide después de un retardo de 3 minutos para asegurar el consumo del piruvato endógeno presente en la muestra. El rango lineal de la concentración de ALT es de 5 U/L a 400 U/L. El valor de corte entre muestras normales y muestras con ALT alteradas se estableció en 49 U/L.

I.2.2.3. Sensibilidad de las pruebas de cribado. Los periodos de ventana serológica.

Según se han ido desarrollando las diferentes técnicas para la detección de los distintos marcadores directos (anticuerpos, antígenos, ARN-VHC) e indirectos (ALT) de la infección por VHC, ha ido incrementando la sensibilidad y especificidad de las mismas¹⁹. Las técnicas de cribado de detección de anticuerpos han ido aumentando la sensibilidad en las diferentes generaciones de reactivos, aunque son, en general, poco específicas. Las técnicas de detección de antígenos también han ido aumentando la sensibilidad en las diferentes versiones, pero no son equiparables en sensibilidad a las técnicas NAT de detección de ARN-VHC⁶⁰. Las técnicas NAT para la detección de ARN-VHC también han ido aumentando en sensibilidad tanto para mezclas de plasma como en muestra individual⁶².

La aparición de los distintos marcadores de infección por VHC en un individuo infectado ocurre en distintas etapas: Primero tiene lugar el periodo eclipse durante el cual el huésped presenta viremia muy baja e intermitente, pudiendo ser infectivo^{68, 69}, y cuya duración se ha podido estimar en 5 días (hay que tener en cuenta que 1 copia vírica/20 mL es infectiva y el límite de detección de la técnica TMA ARN-VHC al 50% es de 4.8 copias/mL⁶⁸). Después aparece el denominado periodo ventana o intervalo de tiempo durante el cual el huésped es infectivo pero no se detectan marcadores de infección. La duración de este periodo ventana dependerá del marcador considerado y de la sensibilidad de la técnica empleada para la detección del mismo. La media estimada de la duración de este periodo ventana, según el marcador considerado es el siguiente:

- 1) Anticuerpos anti-VHC de 1ª generación: 153 días (entre 70 y 273 días)³⁸.
- 2) Anticuerpos anti-VHC de 2ª generación: 82 días (entre 54 y 192 días)⁷⁰.
- 3) Anticuerpos anti-VHC de 3ª generación: 66 días (entre 38 y 94 días)⁷¹.
- 4) Antígeno VHC de 1ª generación: 14 días⁶⁰.
- 5) Antígeno VHC de 2ª generación: 11 días⁶⁰.
- 6) ARN-VHC (mezclas de unidades): 10 días (entre 7 y 12 días)^{62, 72}.
- 7) ARN-VHC (muestra individual): 7 días⁶².

Para la medida del periodo ventana se requiere establecer la fecha de

exposición al agente infeccioso, el tiempo que pasó en desarrollar síntomas de la infección y la recogida de diferentes muestras del individuo en intervalos de tiempo reducido para definir exactamente la fecha de seroconversión para cada marcador infeccioso⁴⁰. Este estudio debe realizarse con un gran número de individuos para establecer el rango de los periodos ventana. Hay dos maneras de analizar el periodo ventana de la infección. El primero de los métodos consiste en un análisis retrospectivo de los receptores de la donación de sangre con técnicas de cribado más sensibles, que permite saber la fecha de seroconversión del marcador infeccioso estudiado, ya que se conoce la fecha de infección (fecha de transfusión). Para este análisis se necesita disponer de distintas muestras del receptor en intervalos de tiempo pequeños. El segundo de los métodos es el estudio de las muestras de los donantes repetidores. Este estudio se realiza mejor en donantes de plasma, en los que los intervalos entre donaciones son más pequeños y el número de donaciones es mayor. Sin embargo es muy difícil determinar la fecha exacta de infección en estos donantes. Cuando no ha sido posible aplicar los métodos anteriores para poder calcular el periodo ventana se han utilizado aproximaciones matemáticas para estimar su duración, relacionándola con el intervalo entre las donaciones seronegativa y seropositiva para un marcador de la enfermedad y con la transmisión de la enfermedad al receptor por la transfusión de la donación seronegativa⁴⁰.

Los datos estimados del periodo ventana junto a los datos obtenidos de la incidencia de la enfermedad en los donantes de sangre nos permiten hacer un cálculo de la estimación del riesgo residual o riesgo de infección asociada a la transfusión³.

I.2.2.4. Pruebas complementarias o de confirmación del VHC: inmunoblot. Limitaciones de las pruebas complementarias.

El valor pronóstico de resultados positivos de las pruebas de cribado es bajo en las poblaciones de bajo riesgo de infección como son los donantes de sangre. Es necesaria la utilización de pruebas complementarias para diferenciar entre las muestras realmente positivas frente a anticuerpos anti-VHC y los falsos positivos. Las pruebas confirmatorias deben diferir de las pruebas de cribado no

sólo en el formato de la prueba sino también en los antígenos usados en la detección¹⁹.

1. Inmunoanálisis en tira inmunoabsorbente (RIBA: Recombinant Immunoblot Assay) de 1ª generación (RIBA HCV 1.0 CHIRON). Es un inmunoanálisis en tira de nitrocelulosa que contiene el antígeno original 5-1-1 producido en *Escherichia coli* y el antígeno c100-3 producido en células de levadura, así como la superóxido dismutasa humana (SODh) que representa la proteína de transporte que permiten el descarte de falsos positivos y dos controles de IgG que sirven como control de dispensación de muestra y para puntuar la intensidad de las bandas de los diferentes antígenos con respecto a las mismas.

Un resultado positivo de esta prueba es cuando dos bandas son reactivas, un resultado indeterminado es cuando una banda de antígenos VHC es reactiva o cuando hay dos bandas reactivas y la banda SODh es también reactiva.

2. Inmunoanálisis de neutralización de anticuerpos anti-VHC de 1ª generación. Esta técnica emplea un fragmento purificado de la proteína recombinante C100-3 obtenida en *E.coli* para neutralizar los anticuerpos anti-C100-3 contenidos en la muestra de suero; así queda bloqueada su reactividad frente a otra proteína recombinante clonada en levaduras que se añade posteriormente. La detección se realiza de forma paralela en las muestras de suero con el antígeno bloqueador y sin él, considerándose positivo un porcentaje de neutralización mayor del 50%.

3. RIBA de 2ª generación (RIBA HCV 2.0 CHIRON). Reemplazó enseguida a la versión de 1ª generación. Se añadieron a la tira de nitrocelulosa con los antígenos c100 y 5-1-1 existentes dos antígenos recombinantes nuevos^{48, 73}. Estos nuevos antígenos son la proteína estructural c22, codificada por la región del core y la proteína no estructural c33 de la región NS3 del genoma del VHC. La interpretación de los resultados era igual que en la prueba de 1ª generación. La muestra era positiva si presentaba, al menos, dos reactividad con distintos antígenos, aunque algunos investigadores no dieron valor a dos reactividades si éstas eran con el antígeno c100 y con 5-1-1, ya que detectaban el mismo anticuerpo (región NS4 del genoma del VHC)⁷⁴. Los resultados se consideraban indeterminados si solo tenían una reactividad. La sensibilidad y la especificidad aumentó considerablemente con esta versión de reactivos con respecto a los de 1ª generación, corroborando los resultados positivos y dando

resultado negativo en algunos casos indeterminados^{75, 76}. Así, en donantes de sangre, el 50% de las unidades positivas con la técnica de cribado ELISA de 2ª generación fueron en un 25% RIBA 2ª generación negativo y en otro 25% RIBA indeterminado^{77, 78}. Más de un 50% de los casos indeterminados presentaron la reactividad con el antígeno c22 de la región del core⁷⁵.

4. RIBA de 3ª generación (RIBA HCV 3.0 CHIRON): La especificidad y la sensibilidad de esta versión mejoró a la 2ª versión. Se mejoró la detección de los antígenos c33 de la región NS3 del genoma del VHC⁷⁹ y se introdujo otro antígeno NS5 relacionado con la función replicasa del VHC. A estos dos antígenos se les fusionó proteínas con SODh y se introdujo una banda más en la tira de nitrocelulosa para su detección. El control SODh permite la detección de anticuerpos contra SODh que no son específicos de los antígenos recombinantes del VHC del inmunoanálisis. La reactividad con SODh en presencia de otra o más reactividades se interpreta como un resultado indeterminado. Los resultados son positivos cuando hay reactividad con al menos dos diferentes antígenos¹⁹.

Limitaciones de las pruebas serológicas de confirmación:

1. Las pruebas de confirmación de 1ª generación tenían especificidad y sensibilidad bajas y del mismo orden que las pruebas de cribado de 1ª generación⁷⁴.

2. La prueba de confirmación de neutralización de 1ª generación permitió eliminar un cierto número de falsos positivos⁴⁹.

3. La prueba de confirmación de 2ª generación dio lugar a resultados indeterminados. Se dieron casos indeterminados o reactivos al antígeno c22 (core) (10%-25%) en pacientes inmunodeprimidos que tenían el ARN-VHC detectable. También se encontró ARN-VHC en casos indeterminados al antígeno c33 y excepcionalmente para el antígeno c100 en este tipo de pacientes^{19, 74, 80, 81}.

4. En las pruebas de confirmación de 3ª generación, la introducción del antígeno NS5 da lugar en algunos casos a resultados falsos positivos y no hay documentado ningún caso indeterminado con la banda NS5 y el ARN-VHC positivo⁸².

5. Los resultados indeterminados de las pruebas de confirmación serológica de 2ª y 3ª generación tienen distintas interpretaciones: pueden ser falsos positivos, deberse a anticuerpos residuales tras la recuperación, o a anticuerpos parciales en respuesta a determinados subtipos de VHC o ser VHC

positivo (confirmado por la presencia de ARN-VHC)¹⁹. La mayoría de los casos indeterminados son falsos positivos debido a que las muestras no reaccionan con otro tipo de prueba de detección de anticuerpos anti-VHC o de ARN-VHC^{77, 78}. Además, estos casos indeterminados no han sido asociados con daño hepático mediante estudios histológicos. Los casos indeterminados que presentan ARN-VHC positivo se deben a respuestas inmunológicas a sólo un tipo de antígeno VHC, debido a una carga vírica baja o por un subtipo de VHC determinado^{83, 84}, y se dan mayoritariamente en pacientes con tratamiento inmunosupresor. Estos casos indeterminados con el ARN-VHC positivo, también se dan en individuos inmunocompetentes en la fase aguda de la infección por VHC, durante la seroconversión⁵⁴.

6. Con la técnicas serológicas de confirmación, además de los casos indeterminados, se dan casos de falsos positivos. Éstos aparecen con cierta frecuencia en la población de donantes de sangre los cuales suelen dar dos reactividades con los antígenos c33, c22, 5-1-1 o NS5 sin que se evidencie ni epidemiológica ni clínicamente infección por VHC⁸⁵. Las razones por las que se dan estos falsos positivos no están claras y la información de estos resultados es insuficiente para un diagnóstico correcto. Por lo tanto es necesario, en estos casos, la detección de ARN-VHC por técnicas NAT para determinar la infección por VHC¹⁹.

7. Entre el 20% y el 50% de las personas infectadas con VHC se recuperan, por lo que no tienen ARN-VHC detectable en plasma. Pero esta situación no confiere inmunidad permanente⁶. En estos casos, la prueba de confirmación serológica tiene resultado positivo, siendo la prueba de detección de ARN-VHC negativa. En algunos de estos casos la prueba de confirmación es indeterminada ya que está descrita la pérdida de antígenos VHC tras la recuperación o cuando la infección no está activa, donde puede haber reactividad frente a anticuerpos anti-VHC del core (C22c) en la prueba de confirmación⁵⁵.

8. En las fases tempranas de la infección primaria por VHC, hay un periodo de seronegatividad o periodo ventana en que el único marcador de la enfermedad es el ARN-VHC⁴⁹.

Las pruebas serológicas de confirmación empleadas en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana son:

1. RIBA de 1ª generación (RIBA HCV 1.0 CHIRON). Esta prueba se

utilizó entre julio de 1990 y febrero de 1991. La prueba consiste en tres etapas:

1ª etapa: La muestra se diluye e incuba con la tira. Los anticuerpos VHC se fijarán a las correspondientes bandas de antígeno, eliminándose los componentes séricos o plasmáticos no fijados por aspiración y lavado.

2ª etapa: La tira de nitrocelulosa se incuba en presencia de un conjugado de IgG antihumana de cabra marcada con peroxidasa. El conjugado se fija a la porción de IgG humana del complejo antígeno- anticuerpo. La eliminación del conjugado no fijado se realiza por decantación y una serie de lavados.

3ª etapa: Se añade un sistema colorimétrico de detección enzimática compuesto por peróxido de hidrógeno y 4-cloro-1-naftol. Si la muestra contiene conjugado fijado, la reacción enzimática originará un producto de reacción de color azul-negro en cada banda específica de antígeno o control VHC. Esta reacción enzimática consiste en la oxidación divalente inicial de la enzima peroxidasa por el peróxido de hidrógeno y en la posterior reducción de la peroxidasa mediante dos interacciones univalentes sucesivas con el 4-cloro-1-naftol que se transforma en un producto de color. La reacción se detiene eliminando los reactivos por decantación y unos pasos de lavado. La reactividad de las muestras hacia cada banda de antígeno se determina comparando visualmente la intensidad de la banda antigénica individual con la de las bandas de control interno con IgG humana de alta y baja concentración, que indicarán la intensidad de las bandas (IgG alta concentración: intensidad +3 e IgG baja concentración: intensidad +1).

La interpretación de los resultados es el siguiente:

a. Resultado negativo: Ninguna banda de antígenos VHC marcada o con una intensidad menor que la banda de IgG de baja concentración (<+1).

b. Resultado positivo: Las dos bandas de antígenos VHC marcadas con una intensidad igual o mayor que la banda de IgG de baja concentración (+1).

c. Resultado indeterminado: Una única banda marcada con una intensidad igual o mayor que la banda de IgG de baja concentración (+1) o la banda SODh marcada con una intensidad $\geq +1$, independientemente de las bandas de antígeno VHC marcadas.

2. RIBA de 2ª generación (RIBA HCV 2.0 CHIRON). Esta técnica reemplazó a la anterior de 1ª generación y se empleó entre marzo de 1991 y mayo de 1993. Las diferentes etapas de la técnica y la interpretación de los resultados

no variaron respecto a la técnica RIBA 1ª generación.

3. RIBA de 3ª generación (RIBA HCV 3.0 CHIRON). En junio de 1993 se empezó a utilizar esta técnica de 3ª generación, que se sigue empleando en la actualidad, y que reemplazó a la versión de 2ª generación. Esta última versión añade la proteína recombinante NS5 a los antígenos recombinantes presentes en la versión de 2ª generación y unifica en una banda a los antígenos 1-1-5 y c100p. Las distintas etapas de la técnica y la interpretación de los resultados es igual que en las versiones anteriores.

I.2.2.5. Actitud ante los donantes con resultados anómalos en las pruebas serológicas.

En el Real Decreto 1088/2005 del 16 de septiembre de 2005 ²⁹ que derogaba los anteriores Reales Decretos y Ordenes (Real Decreto 1945/1985, Real Decreto 1854/1993, Orden del 7/2/1996, Orden del 2/6/1998, Orden del 2/7/1999, Orden SCO/1647/2002 y Real Decreto 62/2003) se establecen los criterios de interpretación de las pruebas de detección de agentes infecciosos en las donaciones para garantizar la seguridad transfusional. Estos criterios son aplicados por los diferentes centros y servicios de transfusión con algunos matices. El Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana sigue los siguientes criterios:

1. Se realizarán las pruebas de cribado pertinentes en las que únicamente se aceptarán donaciones con resultados inequívocamente negativos.

2. En las pruebas de cribado, cuando una muestra sea inicialmente reactiva o dudosa se repetirá por duplicado con la misma muestra o procedente de la misma donación. Si las dos repeticiones son negativas, se eliminará la unidad pero se aceptará al donante. Si una o las dos repeticiones son positivas o dudosas, se eliminará la unidad y se realizarán las pruebas de confirmación.

3. Las pruebas de confirmación tendrán una metodología distinta a las pruebas de cribado y según los resultados obtenidos se procederá de este modo:

3.1. Si las pruebas de confirmación son negativas, se podrá aceptar al donante, siempre y cuando las pruebas de cribado resulten inequívocamente negativas, siguiendo protocolos de readmisión.

3.2. Si las pruebas de confirmación son positivas se informará adecuadamente al donante de dichos resultados y se analizará una segunda muestra.

3.3. Si se vuelven a dar los mismos resultados se excluirá definitivamente al donante, derivándole a su médico de cabecera.

3.4. Si las pruebas de confirmación son indeterminadas también se informará al donante y se analizará una segunda muestra. Si se vuelven a dar los mismos resultados, se excluirá temporalmente al donante y se le realizará un seguimiento adecuado. Los donantes excluidos temporalmente se volverán a aceptar si los resultados de una segunda muestra son negativos para la prueba de cribado y la prueba de confirmación.

4. Cuando en una donación, las pruebas de confirmación sean positivas o indeterminadas, se realizará una investigación retrospectiva. Es decir, se informará lo antes posible a los centros a los que se les hayan remitido los componentes sanguíneos de las donaciones anteriores del mismo donante, para la retirada precautoria de los componentes no utilizados y también se informará al centro de tratamiento del plasma sobre donaciones anteriores del mismo donante para la adopción de medidas oportunas.

I.2.2.6. Pruebas basadas en la tecnología NAT.

Las técnicas NAT se utilizan en el análisis de las unidades de sangre principalmente para la detección virus transmisibles por transfusión sanguínea como son el VHC, el VIH1 y el VHB. En Estados Unidos también se detecta el virus del Nilo Occidental.

Las principales ventajas de la utilización de estas técnicas son:

a. Disminuyen el periodo ventana de estas infecciones respecto a las técnicas serológicas, siendo de 11, 10 y 39 días para VIH1, VHC y VHB, respectivamente, para pruebas en mezclas de plasma. Si se realizan en muestra individual los periodos ventana son de 7 días para VIH1 y VHC y de 20 días para VHB⁶².

b. Son pruebas de una gran especificidad y sensibilidad que superan a la mejor de las técnicas serológicas, cuando se trata de identificar pacientes que

sufren la infección persistente por el VHC^{86, 87}.

c. Detección de varios virus en una misma reacción (Ensayos *multiplex*)²². Esta posibilidad ha sido realidad empleando cebadores y sondas específicas para cada patógeno diana en un solo tubo. Los ensayos *multiplex* requieren unas condiciones de reacción de amplificación y detección compatibles que permitan una amplificación y detección con una sensibilidad y eficiencia adecuadas para cada secuencia diana. La posibilidad de amplificar varias secuencias distintas en un solo tubo de reacción ha sido demostrada por varias tecnologías que son empleadas actualmente.

Las desventajas que se han dado en la utilización de esta tecnología en los Centros de Transfusión y Bancos de sangre son:

a. Falsos positivos por contaminación cruzada²². Este problema se solucionó separando los laboratorios en dos zonas, una de preamplificación o preparación de muestras y otra zona de amplificación-detección del material genético. Para evitar la contaminación externa de las muestras, se utilizan cabinas de flujo laminar, puntas con filtro y rigurosos controles del proceso. También se utilizan procedimientos para inactivar previamente el producto amplificado antes de la amplificación propiamente dicha, mediante la acción de la enzima uracil-N-glicosidasa (UNG). La acción de esta enzima se basa en la utilización de dUTP en vez de dTTP en las reacciones de amplificación, así la enzima rompe selectivamente las secuencias con dUTPs formadas antes de la reacción de amplificación y que serían productos potencialmente contaminantes^{22, 88}.

b. Falsos negativos por fallos en los cebadores de amplificación o en las sondas empleadas para detectar el producto amplificado. Este problema se ha solucionado centrando las reacciones de amplificación en secuencias muy conservadas del genoma (ej: región 5'- no traducida del VHC, común a todos los genotipos y subtipos) y por el empleo de baterías de cebadores y sondas dirigidas a las variantes conocidas de secuencia y diseñadas para tolerar una menor tasa de errores^{22, 89, 90}. Para evitar este problema también se utilizan controles internos en cada muestra. Éstos son secuencias de ácidos nucleicos de idéntico tamaño a la secuencia diana que se van amplificar al mismo tiempo y utilizando los mismos cebadores. Este control interno va a dar la seguridad de que se ha producido la reacción de amplificación en las muestras con resultado negativo para la secuencia diana⁹¹⁻⁹³.

c. Falta de automatización. Inicialmente estas tecnologías eran totalmente manuales, no siendo posible su utilización para el análisis de gran número de muestras y se utilizaban solamente como confirmación de resultados de las técnicas serológicas de detección de anticuerpos o antígenos. A lo largo del tiempo se han ido desarrollando y mejorando las diferentes técnicas de amplificación genómica para adecuarla al cribado en masa de las donaciones de sangre para la detección simultánea de material genético de diferentes virus transmisibles por transfusión sanguínea (VIH1, VHC y VHB) tanto en análisis individual como en análisis en mezcla de plasma de distintas unidades de sangre (pool)^{86, 94, 95}.

La PCR fue descrita por K.B Mullis en 1987⁹⁶ y la primera aplicación para la detección de un agente infeccioso (VIH) fue en 1988⁹⁷. A principios de la década siguiente esta técnica ya se utilizaba para la detección del VHC en sangre⁹⁸.

La PCR es de las técnicas más sensibles y utilizadas en investigación por su gran versatilidad en el análisis de ARN y ADN. Pero las patentes realizadas por distintas firmas comerciales han dado lugar al desarrollo de otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para su aplicación comercial y la aparición de estrategias nuevas para la detección de las secuencias del producto amplificado y para la detección por amplificación de señal mediante sondas²².

- Las distintas técnicas NAT constan de tres partes fundamentales:

1. Preparación y extracción de los ácidos nucleicos.
2. Amplificación del producto extraído.
3. Detección del producto amplificado.

1. Preparación y extracción de los ácidos nucleicos: Para la detección de virus en sangre la muestra biológica que se va a analizar suele ser plasma, aunque también puede detectarse el ADN provírico en las células sanguíneas (población leucoplaquetar) por ejemplo en el caso del VIH. Para la extracción del ARN vírico hay que tener en cuenta la extremada labilidad del ARN, que obliga a extremar las precauciones para evitar su degradación por nucleasas y obtener preparaciones de ARN puro e íntegro. En este paso de extracción es necesaria la ruptura de los virus, desnaturalización de los complejos de nucleoproteína, inactivación de las ribonucleasas (RNAsas) endógenas y eliminación de las trazas

de ADN y proteínas contaminantes⁹⁹. Esta parte ha sido la última en automatizarse siendo hasta ahora larga y laboriosa. Hay distintos métodos de extracción de ADN y ARN aplicados a la detección de virus en sangre. La mayoría de estos métodos están comercializados por las grandes empresas farmacéuticas, aunque hay laboratorios que han estandarizado sus propios métodos de extracción “in house”.

1.1. Extracción del ADN provírico de virus en las células leucoplaquetarias: La preparación de la muestra implica la liberación del ADN de la célula mediante degradación de las proteínas y lípidos de las membranas celulares con proteasas de alta actividad endopeptidasa, como la proteinasa K de *Tritirachium album*, y detergentes suaves como Tritón X-100, Nonidet P-40, Tween-20, Laureth 12 o Sarcosyl^{22, 97, 99}.

1.2. Extracción del ADN o ARN vírico en plasma humano. Hay una gran variedad de métodos. Estos métodos son de tipo *multiplex*²² de manera que una misma extracción sirve para detectar distintos patógenos, y todos incluyen un control interno que es una molécula de ácido nucleico de similar tamaño que el ácido nucleico diana que se va a amplificar al mismo tiempo, pero su detección será diferente⁹¹⁻⁹³.

Los métodos más usados para la extracción de ácidos nucleicos de los distintos patógenos transmisibles por transfusión sanguínea son:

1.2.1. Método Multiprep de ROCHE⁹¹: Extracción de ácidos nucleicos virales de una muestra de plasma mediante un agente caotrópico como es el tiocianato de guanidinio (GuSCN) que desnaturalizará todas las proteínas preservando el ARN de la degradación enzimática. Posteriormente, se aislarán los ácidos nucleicos por precipitación mediante alcoholes. Hay un método estándar para muestras individuales de plasma y otro método para trabajar con mezclas de plasmas que incluye una ultracentrifugación previa de 1 hora a 23600 g para concentrar las partículas virales y así aumentar la sensibilidad de la técnica. Es un método no automatizado.

1.2.2. Método de captura del ácido nucleico diana de GEN-PROBE/CHIRON: Es un método donde se aíslan los ácidos nucleicos víricos de muestras de plasma mediante el uso de una captura selectiva. El plasma se trata con un detergente para solubilizar la envoltura viral, desnaturalizar proteínas y liberar los ácidos nucleicos. Se añaden posteriormente oligonucleótidos de

captura que son homólogos a regiones conservadas de los ácidos nucleicos diana y que se hibridarán si están presentes. Por último el producto hibridado se unirá a micropartículas magnéticas que se separan del plasma en un campo magnético. La separación magnética y los distintos lavados para eliminar los productos no unidos se realiza mediante un sistema de captura selectiva. Esta parte de extracción de ácidos nucleicos está actualmente automatizada con el aparato TIGRIS GEN-PROBE/CHIRON, que es un sistema que integra la extracción, amplificación y detección de ácidos nucleicos^{92, 100}.

1.2.3. Métodos de separación de ácidos nucleicos por filtración mediante membrana de gel de sílice:

1.2.3.1. Método “Nuclisens” de Organon Técnica, el cual utiliza GuSCN como solución de lisis para romper las proteínas y extraer los ácidos nucleicos, que son aislados y purificados por filtración en membrana de gel de sílice. Este método tiene una versión manual donde la filtración es por centrifugación y otra versión automatizada donde la separación de los ácidos nucleicos se realiza a través de un filtro de gel de sílice por presión de vacío^{101, 102}.

1.2.3.2. Método “Qiamp” de Qiagen. Este método utiliza temperaturas elevadas para romper y desnaturalizar las proteínas; posteriormente se añaden proteasas para inactivar enzimas (RNasas) y unas sondas de ARN (*carrier RNA*) que potenciarán la unión de los ácidos nucleicos a la membrana de gel de sílice y protegerán el ARN vírico de la acción de las RNasas que puedan estar aún presentes tras la acción de las proteasas. Por último se añade etanol para mejorar el rendimiento de unión de los ácidos nucleicos al filtro de sílice y se realiza la filtración a través de una membrana de gel de sílice por presión de vacío. Este método está automatizado con el sistema BIOROBOT 9604¹⁰³⁻¹⁰⁵. El Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana evaluó este sistema automatizado de extracción de ARN, para su uso conjunto con la tecnología NAT “PCR Cobas Ampliscreen”, para la detección de ARN-VHC y ARN-VIH1.

Las conclusiones que se extrajeron de este estudio fueron¹⁰⁵:

1. No se producen contaminaciones cruzadas.
2. Se evitan las inhibiciones del control interno.
3. Automatizando todo el proceso no se aumenta la sensibilidad para la detección de ARN-VHC y ARN-VIH1.

4. El tiempo de proceso con la extracción automática de ácidos nucleicos es el mismo que el tiempo empleado en la extracción manual (PCR Ampliscreen).

1.2.4. Método “Ampliprep” de Roche. El método consiste en una digestión de la muestra con una solución de proteasa y GuSCN para romper las proteínas del plasma y cubiertas víricas, inactivar nucleasas y liberar los ácidos nucleicos víricos. Los ácidos nucleicos liberados se unen a la superficie de sílice de partículas magnéticas debido a que está cargada positivamente y los ácidos nucleicos están cargados negativamente en un medio con una fuerza iónica adecuada proporcionada por la solución de lisis. Por último los ácidos nucleicos son liberados por altas temperaturas en una solución tamponada. Este método también está automatizado⁹³.

1.2.5. Otros métodos de extracción de ácidos nucleicos.

Estos métodos utilizan una gran variedad de compuestos para aislar los ácidos nucleicos, y se basan en los principios vistos anteriormente con los métodos de extracción comercializados. Para la extracción de ARN suele emplearse como agentes caotrópicos el RNazol B, cloroformo en hielo o GuSCN, seguido de una precipitación mediante isopropanol, acrilamida y etanol o fenol y cloroformo. Por último se realiza una resuspensión de los ácidos nucleicos con agua bidestilada con inhibidores de RNAsas (β -mercaptoetanol o dietilpirocarbonato)⁹⁹. Estos métodos no están automatizados, siendo totalmente manuales.

2. Amplificación del producto extraído para la obtención de múltiples copias del mismo. Las principales técnicas NAT que se han utilizado para la detección de patógenos transmitidos por transfusión sanguínea son²²:

2.1. PCR

2.2. TMA (Amplificación mediante la transcripción)/ NASBA (*Nucleic acid sequence-based amplification*).

2.3. ADN-ramificado (*branched-DNA*)

2.4. LCR (Reacción en cadena de la Ligasa)

2.5. SDA (Amplificación por desplazamiento de la cadena)

2.1. PCR. En esta tecnología molecular hay distintas variantes que se han utilizado principalmente:

2.1.1. PCR simple: La técnica PCR utiliza pares de primers o cebadores

que se unen específicamente a regiones conservadas que delimitan la secuencia diana que interesa detectar. Consiste en varios ciclos repetitivos de calentamiento, para desnaturalizar o separar las cadenas de ADN y de enfriamiento, para la unión de los cebadores. Este proceso de síntesis de ADN se repite un número determinado de veces, multiplicando de forma exponencial el número de copias de la secuencia diana. Si n es el número de de ciclos, al final del proceso se obtendrán 2^n copias de la secuencia inicial; por ejemplo, 30 ciclos de amplificación pueden producir 1000 millones de copias de la secuencia diana⁹⁶.

2.1.2. PCR anidada: Es de las primeras técnicas NAT que se utilizaron. Se trata de una variante de la PCR simple que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de primers o iniciadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de la detección. Primero se realiza una reacción con unos iniciadores externos, para amplificar una región de ADN extensa que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con unos iniciadores internos para amplificar la región específica. Esta técnica tiene dos inconvenientes importantes: el primero es que no está automatizada y el segundo, que el porcentaje de falsos positivos por contaminación es mayor que en otras técnicas NAT²⁶.

2.1.3. RT-PCR: Se trata de una PCR que utiliza como molde de partida ARN en vez de ADN. Se adapta perfectamente a la detección de ARN vírico del VIH y VHC. La RT-PCR es una PCR combinada con un proceso previo de transcripción inversa, en el que la secuencia nucleotídica del ARN diana es copiada o retro-transcrita a ADN complementario (ADNc) por acción de una retrotranscriptasa. El proceso requiere un cebador que permita el inicio de la síntesis de ADNc, además de desoxirribonucleotidos (dNTPs) e inhibidores de RNasas (o algún método de inactivación previa del producto amplificado). La reacción de retrotranscripción tiene lugar a una temperatura y durante un tiempo adecuado; después se necesita un calentamiento para desnaturalizar el híbrido ARN-ADNc e inactivar la retrotranscriptasa. Sobre el ADNc obtenido se realiza posteriormente la técnica PCR estándar²³.

2.1.4. PCR en tiempo real: Se han desarrollado recientemente equipos totalmente automatizados donde los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en un mismo vial cerrado. Además, mediante

detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores, para llevar a cabo la reacción de PCR a tiempo real, incorporan un lector de fluorescencia y pueden medir, en cualquier momento, la fluorescencia en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. En la PCR en tiempo real se emplean sondas marcadas con fluoróforos, el tiempo de ensayo es menor que las técnicas PCR convencionales y los riesgos de contaminación son también menores debido a que se trata de un sistema cerrado. Presenta una linealidad cuantitativa donde el rango dinámico se amplía considerablemente respecto a la PCR convencional (pasa de 2-3 log a 5-6 log). Los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos^{24, 25}.

2.2. TMA / NASBA.

Las técnicas TMA y NASBA son similares y se dan en único paso mediante una reacción de amplificación isotérmica que se realiza por un ciclo continuo de transcripción reversa y transcripción de ARN para hacer múltiples copias de un ARN/ADN diana. Los cebadores que contienen una secuencia promotora para la unión de la polimerasa RNA se unen a la secuencia complementaria del ácido nucleico diana y se inicia la formación de una cadena complementaria de ADNc por una transcriptasa reversa. Mediante la adición de ARNasas se degrada la cadena de ARN, formándose ADNc de doble cadena (cADNds) que contiene la región promotora para la unión de la ARN polimerasa. La ARN polimerasa se une al cADNds y transcribe múltiples copias de ARN, las cuales sirven de diana para la hibridación de un segundo cebador, llevando a un nuevo ciclo de síntesis de ADNc de cadena simple (cADNss), degradación de ARN y síntesis de cADNds. El proceso se repite autocatalíticamente, obteniéndose múltiples copias del ácido nucleico inicial^{22, 27, 28}.

2.3. ADN ramificado.

La técnica ADN ramificado es cuantitativa y está basada en el principio de amplificación de la señal y no en la amplificación del ácido nucleico. El ácido nucleico liberado de la célula o cápsula vírica es fijado a una fase sólida mediante el uso de unas sondas específicas de captura. Seguidamente, se añade un segundo

grupo de sondas (*extender*) que se unen al ácido nucleico diana fijado al soporte. Acto seguido se adiciona el ADN ramificado (bDNA), que es un compuesto sintético multímero con una estructura ramificada que se unirá a las sondas *extender* y a su vez, se unirá a gran cantidad de oligonucleótidos marcados enzimáticamente. Al adicionar una sustancia luminiscente (dioxitano) se producirá una reacción de quimioluminiscencia cuya señal de luz será cuantificada por un luminómetro. Como no se produce producto amplificado no hay problemas de contaminación, no requiriéndose tanto cuidado como en las técnicas NAT, pero la sensibilidad de esta técnica es inferior por lo que no se usa en el cribado de donaciones de sangre. Sin embargo, es una técnica utilizada para la cuantificación de ácidos nucleicos²².

2.4. LCR

Es una reacción enzimática que permite la amplificación de una determinada secuencia de ADN, pero a diferencia de la técnica PCR, la amplificación no está mediada por la ADN polimerasa sino que se realiza con una ligasa termoestable de gran especificidad. La técnica emplea dos parejas de cebadores complementarios de la secuencia de ADN que queremos detectar, pero están diseñados para dejar un hueco entre ellos cuando se acoplan a cada hebra de ADN diana. Así en un primer paso se desnaturaliza la cadena de ADN a 95°C, después se unen las parejas de cebadores a 65°C y se añade una ligasa que rellena el hueco con dNTPs entre los cuatro cebadores. El resultado son dos cadenas de ADN nuevas; por iteración sucesiva del proceso se consigue duplicar en cada ciclo el número de copias de la secuencia diana. Esta técnica se ha comercializado inicialmente para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*, virus del Papiloma Humano y *Neisseria gonorrhoea* que son patógenos no transmisibles por transfusión^{22, 106}.

2.5. SDA

Es un procedimiento de amplificación exponencial de una secuencia diana que requiere una sola temperatura de reacción (isotermo). La técnica utiliza una enzima de restricción que rompe en un sitio determinado el ADN diana. Se desnaturaliza el ADN y se añaden dos cebadores que se unirán a los extremos de cada cadena. Los cebadores contienen el sitio de restricción donde la enzima de restricción romperá la cadena; después una polimerasa ADN copia las cadenas en dirección 5'-3' utilizando desoxiadenosin-5'-alfa-tioltrifosfato en vez de dATPs,

así queda protegida la cadena complementaria, quedando desprotegidos los cebadores que volverán a regenerar el sitio de restricción por donde la enzima de restricción romperá la cadena. Después de varios ciclos obtenemos múltiples copias de la secuencia diana^{22, 107}.

3. Detección del producto amplificado.

Los distintos métodos de detección empleados en las técnicas de amplificación genómica pueden ser específicos de secuencia y no específicos.

3.1. Separación electroforética en gel con bromuro de etidio de las secuencias amplificadas por su tamaño específico y visualización de estas bandas mediante radiación UVA.

3.2. Empleo de sondas radiactivas, sondas fluorescentes o sondas marcadas con un enzima que se hibridan internamente de manera específica con el producto amplificado.

3.3. Técnica de detección por EIA o CLhIA mediante sondas específicas que revisten pocillos de microplaca o partículas magnéticas, a las cuales se une el producto amplificado marcado con biotina. En la reacción de amplificación se emplean cebadores marcados con biotina por lo que el producto amplificado estará marcado con esta molécula; posteriormente se añade un conjugado de avidina que se unirá a la biotina del producto amplificado; después se añade una enzima como la peroxidasa que se unirá al conjugado de avidina, y por último se adiciona una molécula colorimétrica que actuará de substrato de la peroxidasa, dando color cuya densidad óptica será detectada por un espectrofotómetro²².

3.4. Técnica de protección de hibridación (HPA) donde sondas marcadas con ester de acridinio se añaden a la reacción de amplificación. Estas sondas hibridan con secuencias específicas de producto amplificado. Posteriormente se añade un reactivo de selección que hidroliza las sondas que no se han unido al producto amplificado. Por último se añade un peróxido y una base que hace que las sondas hibridadas de ester de acridinio emitan quimioluminiscencia, que se detecta mediante un fotómetro¹⁰⁸.

3.5. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en las técnicas basadas en PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas de hibridación²⁵.

3.5.1. Agentes intercalantes: Son fluoróforos que aumentan considerablemente la emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble

hélice. El más utilizado es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. La ventaja de estas sondas es la fácil optimización de las condiciones de reacción para su correcto funcionamiento. El inconveniente es que es un método poco específico porque el SYBR se une a cualquier dímero que se forme en la reacción, por lo que hay que optimizar las condiciones de reacción (temperatura de reacción alta, cebadores adecuados para la formación de menos dímeros, uso de polimerasas que se activen a temperaturas altas y determinar la temperatura de fusión del producto amplificado para comprobar su especificidad). Otro inconveniente es que no permiten la identificación de polimorfismos.

3.5.2. Sondas de hibridación específicas. Estas sondas están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. El proceso se basa en la transferencia de energía fluorescente mediante resonancia (FRET). El incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. Pueden ser de tres tipos: sondas de hidrólisis, sondas tipo horquilla o bacons y sondas de hibridación FRET.

3.5.3. Sondas de hidrólisis (TaqMan): Este método “Taqman” está basado en el principio de “*nick-translation*” PCR mediante sondas fluorimétricas. Se utilizan sondas que están marcadas con dos fluorocromos (rodamina y fluoresceína) que se unen específicamente al producto amplificado. La rodamina o *dador* absorbe la energía que emite la fluoresceína o *aceptor*. Por lo tanto cuando ambas moléculas están presentes en la sonda, no se emite fluorescencia. Cuando la sonda se une específicamente al producto amplificado entra en acción la *Taq DNA polimerasa* que por su acción 5'-3'-exonucleasa rompe las sondas liberando la molécula *dadora* y la molécula *aceptora*. Entonces se produce la emisión de fluorescencia por la fluoresceína que es proporcional al número de copias de la secuencia inicial. Se pueden utilizar distintas sondas marcadas con diferentes moléculas fluorescentes para detectar diferentes secuencias diana en una simple reacción *multiplex*. Las múltiples emisiones de fluorescencia de las distintas sondas pueden ser detectadas por un lector espectrómetro que puede identificar señales de más de 96 muestras amplificadas por PCR en 7 minutos.

3.5.4. Sondas tipo horquilla o *molecular bacons*: Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula *dadora* en el extremo 5' y una molécula *aceptora*

en el extremo 3'. Además tienen una estructura secundaria en forma de asa en la que reside la secuencia de unión específica al ADN diana. Cuando la sonda no está hibridada los extremos permanecen juntos, con lo que no hay emisión de fluorescencia. Cuando la sonda está hibridada, dador y aceptor están separados por lo que hay emisión de fluorescencia.

3.5.5. Sondas de hibridación FRET: Son dos sondas que se unen a secuencias adyacentes del ADN diana. Una de las sondas lleva el donador en el extremo 3' y la otra el aceptor en el extremo 5'. Cuando las sondas están hibridadas los dos fluorocromos están juntos; el donador al excitarse transfiere energía al aceptor que a su vez emite la fluorescencia que detecta el lector del equipo.

3.6. Sistemas de detección basados en la tecnología de “biochips” y “microarrays”:

Es una tecnología que puede utilizarse en un futuro cercano en el procesamiento de las donaciones de sangre. Los “biochips” contienen distintas posiciones microscópicas donde se encuentran distintos oligonucleótidos unidos a un soporte sólido de silicio, cristal o un polímero plástico. Cada oligonucleótido tiene una secuencia determinada que se une específicamente al ácido nucleico diana, así pueden unirse distintas moléculas de ADN o ARN en una disolución utilizando volúmenes de muestra muy pequeños (nanolitros, picolitros). Según la concentración de ácidos nucleicos en la muestra, necesitaremos amplificarlos mediante una técnica NAT o no. Si los distintos ácidos nucleicos diana se marcan previamente con marcadores fluorescentes y se exponen a la superficie de un biochip con varios cientos o miles de sondas distintas con una localización conocida, mediante un escáner se puede saber que moléculas están en la disolución problema observando el patrón de fluorescencia generado. Esta tecnología permitiría detectar la presencia múltiple de virus, bacterias y protozoos en sangre humana¹⁰⁹.

La prueba NAT de cribado que se ha utilizado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana durante el periodo 1999-2002 ha sido la técnica semiautomatizada PCR Cobas AmpliScreen HCV 2.0-Protocolo para la detección de ARN-VHC en mezclas de plasma.

En julio de 1999 se introdujo esta técnica en el cribado de todas las unidades de sangre en mezclas de 22 unidades de sangre y de 44 unidades,

debido principalmente a la falta de automatización de la técnica. El tamaño final de las mezclas se decidió tras realizar una evaluación multicéntrica de la sensibilidad del reactivo, en la que intervino el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana (CTCV) y siguiendo las recomendaciones de la EMEA (Agencia Europea para el Control de los Medicamentos) con respecto a la sensibilidad mínima de los reactivos para trabajar con mezclas de plasma. El hecho de hacer dos tamaños de las mezclas fue para adecuarlas al funcionamiento y a la cantidad de unidades de sangre fraccionadas en cada centro de transfusión. Así las unidades de Castellón y Alicante se analizaron en pool de 22 unidades y las unidades de sangre de Valencia se analizaron en pool de 44 unidades de sangre. Los tamaños de las mezclas se realizaron con un aparato (dispensador HAMILTON) que se programó para realizar mezclas de 11 unidades. Posteriormente se unían manualmente dos o cuatro mezclas de 11 unidades, para formar una mezcla de 22 o de 44, respectivamente. Las unidades de sangre que eran positivas frente a anticuerpos anti-VHC en la prueba de cribado no entraban en la composición de las mezclas para la determinación del ARN-VHC. Por lo que la serología o determinación de anticuerpos anti-VHC se realizaba antes de la determinación del ARN-VHC.

La técnica Cobas AmpliScreen HCV 2.0 de ROCHE, para trabajar con mezclas de plasma o método multiprep (MP) consiste en cinco etapas:

1ª etapa: Centrifugación a 23600g de cada mezcla de plasma de 1 mL, para concentrar las partículas víricas en el fondo del tubo y así aumentar la sensibilidad de la técnica.

2ª etapa: Extracción y aislamiento del ARN-VHC mediante la adición de un agente caotrópico (tiocianato de guanidinio) el cual rompe la cápside vírica y extrae el ARN. A este reactivo se le añade un control interno de ARN que se amplificará al mismo tiempo que el ARN-VHC y se detectará por separado. Este control interno nos dará la seguridad de que se ha producido la PCR y evitará los falsos negativos de la técnica. Mediante la adición de alcoholes, isopropanol y etanol al 70% se aislará el ARN por precipitación. Esta etapa no está automatizada.

3ª etapa: Amplificación mediante una RT-PCR en los termocicladores del analizador COBAS AMPLICOR. La reacción de transcripción reversa y amplificación se realizan con una enzima recombinante termoestable ADN

polimerasa de *Thermus thermophilus* (rTth pol). En presencia de manganeso (Mn^{+2}) y en condiciones de pH adecuadas, esta polimerasa actúa tanto de transcriptasa reversa como de polimerasa de ADN, lo que hace que la transcripción reversa y amplificación se realice en la misma mezcla de reacción. Mediante transcripción reversa se produce ADN complementario de doble cadena, tanto del ARN-VHC como del ARN del control interno. Después, con los reactivos de amplificación (nucleótidos, iniciadores y polimerasa) se produce la PCR, donde a partir de un ADN de doble cadena se obtiene una copia de una secuencia específica y conservada del genoma del VHC (amplicón). El analizador COBAS AMPLICOR repite automáticamente este proceso durante un número de ciclos determinado, en cada uno de los cuales incrementa exponencialmente la cantidad de ADN amplicón. El número de ciclos requerido se programa previamente en el analizador COBAS AMPLICOR. Para evitar la amplificación inespecífica de otras secuencias de ADN, se utiliza una enzima llamada N-uracil-glicosidasa que está presente en la mezcla de reactivos de amplificación y que romperá las cadenas de ADN de doble cadena que contengan desoxi-uracil-nucleótido. Este desoxinucleótido se añade en la reacción de amplificación en lugar de desoxi-timidin-nucleótido, por lo que el producto amplificado tendrá desoxi-uracil-nucleótido. Esta enzima es estable a menos de 50 °C, rompiendo las cadenas de ADN de doble cadena formadas antes de iniciarse la RT-PCR. Esta enzima se inactiva por temperaturas superiores a 50 °C o sea, cuando se inicia la reacción de amplificación. Cuando termina la reacción de amplificación se inactiva la N-uracil-glicosidasa mediante la adición de la solución de desnaturalización. Tanto esta etapa como las siguientes están automatizadas en el analizador COBAS AMPLICOR.

4ª etapa: Desnaturalización del material amplificado (amplicones) mediante una solución de desnaturalización que transforma el ADN de doble cadena en ADN de cadena simple, e hibridación de los amplicones desnaturalizados con partículas magnéticas revestidas con las sondas de oligonucleótidos específicos y complementarios del producto amplificado.

5ª etapa: Detección del producto amplificado mediante la adición de un conjugado de avidina que se unirá a las moléculas de biotina de los amplicones. Los amplicones están marcados con biotina porque los iniciadores están marcados con esta molécula. El conjugado de avidina está marcado con una

enzima llamada peroxidasa que en presencia de un sustrato con propiedades colorimétricas (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) y peróxido de hidrógeno, dará color, y cuya densidad óptica a 660 nm se mide en un espectrómetro del analizador COBAS AMPLICOR.

La interpretación de los resultados es la siguiente:

a. D.O VHC < 0.200 y D.O control interno \geq 0.200: muestra negativa. En este caso todas las unidades de sangre que componen el pool son ARN-VHC negativas.

b. D.O VHC \geq 0.200 y D.O control interno \geq 0.200 ó < 0.200: muestra positiva. En este caso se debe determinar qué unidad de sangre componente de mezcla es la unidad ARN-VHC positiva. Esta acción se realiza mediante un procedimiento denominado “cruce de dameros” según la tabla 9:

Tabla 9: Cruce de dameros (*).

Unidades de sangre											POOL 44
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Subpool 1
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Subpool 2
23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	Subpool 3
34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	Subpool 4
Subpool 5	Subpool 6	Subpool 7	Subpool 8	Subpool 9	Subpool 10	Subpool 11	Subpool 12	Subpool 13	Subpool 14	Subpool 15	

(*) Donde las unidades de sangre que componen el pool, están numerados del 1 al 44 y los distintos *subpools* que se realizan están numerados del 1 al 15. Así mediante la determinación del ARN-VHC de 15 *subpools* podemos saber que unidad de sangre es ARN-VHC positiva.

c. D.O VHC < 0.200 y D.O control interno < 0.200: muestra inválida. En este caso se repiten los *subpools* primarios con los que se compuso el pool final. Ejemplo: Pool de 44, se repiten los cuatro *pools* de 11 que lo componen.

Las pruebas NAT de detección de ARN-VHC se han utilizado también como prueba de confirmación de las unidades de sangre positivas en la prueba serológica de cribado, sumándose a las pruebas de confirmación serológica.

El Centro de Transfusión ha utilizado como prueba complementaria la técnica PCR AmpliCor HCV de Roche para la detección de ARN-VHC en plasma humano. En junio de 1995 se introdujo como prueba adicional de infección por VHC la técnica manual de ROCHE (AmpliCor HCV Test) y a partir de noviembre de 1997 se empleó la técnica semiautomatizada de ROCHE (Cobas Ampliscreen HCV 2.0-Protocolo para muestra individual).

Las principales diferencias entre estas técnicas y la técnica Cobas Ampliscreen HCV 2.0 –Protocolo para mezclas de plasma, explicada

anteriormente, son las siguientes:

1. Son técnicas para trabajar en muestra individual y no en mezclas de plasma.
2. Se parte de muestras de 200 μ L de plasma y no se realiza la etapa previa de ultracentrifugación.

En la técnica manual Amplicor HCV test no se emplea el aparato Cobas Amplicor, por lo que la etapa de la amplificación de los ácidos nucleicos por PCR se realiza en un aparato termociclador Perkin-Elmer 9600, programado con los ciclos determinados para amplificar el ARN-VHC y la detección se realiza manualmente, utilizando una microplaca con pocillos revestidos de oligosondas específicas complementarias al producto amplificado. Posteriormente se añaden los reactivos de detección, que son los mismos que los empleados en la versión automatizada. Por último se lee la densidad óptica mediante un espectrómetro a una longitud de onda de 450 nm. La interpretación de los resultados es: Positivo ($D.O \geq 0.200$) y Negativo ($D.O < 0.200$). No se añaden controles internos a cada muestra.

I.2.2.7. Implantación de las pruebas basadas en amplificación de ácidos nucleicos en los centros de donación. Determinaciones individuales y determinaciones en mezclas de plasmas de varios donantes.

Siguiendo recomendaciones emitidas para la Industria Farmacéutica y establecidas por el Comité de Especialidades Farmacéuticas de la Agencia Europea del Medicamento (CPMP) en el documento CPMP/BWP/269/95 rev. 2, y en la Guía de Farmacopea Europea, en Julio del 1999 se introdujo en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana la determinación por técnicas NAT del VHC en todas las unidades de sangre, reduciendo el periodo ventana en un 85% (de 66 a 10 días). Posteriormente, la Orden SCO/1647/2002 publicada en el BOE en Julio de 2002, obligaba a todas las donaciones de sangre y de componentes sanguíneos a ser sometidos, desde enero de 2003, a pruebas de detección del VHC por técnicas NAT o por técnicas de detección directa del VHC con similar o superior sensibilidad, y debidamente validadas.

En Febrero de 2004 el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana introdujo también la determinación por técnicas NAT del VIH1 en todas las unidades de sangre reduciendo el periodo ventana de la enfermedad en un 50% (de 22 a 11 días).

El 8 de noviembre de 2005 entró en vigor en España el Real Decreto 1088/2005 por el que la detección del ARN-VHC se hacía obligatoria en todas las donaciones de sangre, descartándose las técnicas de detección directa por serología del antígeno del core del VHC.

Por último en julio de 2006 se automatizó la tecnología NAT con el Sistema Procleix-Tigris de Gen-Probe/Chiron Corporation en muestra individual, reduciendo aún más los periodos ventana de ARN-VHC y ARN-VIH1, quedando ambos en sólo 7 días y se introdujo la determinación del ADN del VHB, disminuyendo el periodo ventana de esta infección de 39 a 20 días (50 %) ⁶².

En la actualidad todos los Centros de Transfusión de España realizan la determinación de ARN-VHC en las donaciones de sangre, casi todos los centros realizan la determinación de ARN-VIH1 y algunos de ellos han empezado a realizar la detección de ADN-VHB por técnicas NAT. En Estados Unidos además de los virus anteriores también se detecta el WNV en las donaciones de sangre desde Julio de 2003 ¹¹⁰.

En España el cribado de donaciones de sangre para la detección de ARN de VHC tuvo que realizarse con mezclas de plasma o *minipools*, debido principalmente a la falta de automatización en la extracción de ARN. Los distintos Centros de Transfusión optaron por *minipools* de tamaño variable realizados por aparatos programados por los mismos centros ^{94, 95}.

Actualmente se dispone de tecnologías NAT totalmente automatizadas y semiautomatizadas que se adaptan al funcionamiento de los centros de procesamiento de las unidades de sangre. Estas pruebas se han puesto en marcha en nuestro país en dos periodos: el primer semestre de 1999 y la segunda mitad de 2005, en algunos casos en un tiempo reducido y con medios humanos y materiales muy ajustados.

Para la implantación de la tecnología NAT en el cribado de unidades de sangre se debe cumplir una serie de requisitos como son:

- 1.** Personal debidamente cualificado para realizar la etapa de extracción de los ácidos nucleicos, la cual suele no estar automatizada y exige una

considerable habilidad.

2. Según el procedimiento utilizado, separación del laboratorio en dos zonas, una para la preparación de la muestra y otra para la amplificación y detección del material genético.

3. Laboratorios provistos de medios materiales para poder realizarla (cabinas de seguridad biológica, dispensador para la preparación de mezclas de plasma, pipetas, puntas con filtro)¹¹¹.

4. El tiempo de proceso necesario para realizar estas técnicas será el adecuado para retrasar lo menos posible la disponibilidad de las unidades de sangre y sus componentes.

5. Los resultados deben estar validados por controles positivos y negativos para cada serie de muestras y por controles internos para cada muestra.

6. Una especificidad próxima al 100% en la mayoría de las técnicas NAT empleadas superior a las pruebas serológicas^{86, 87}.

7. Una sensibilidad adecuada para trabajar con mezclas de plasma o *minipools*.

Para trabajar con mezclas de plasma la Agencia Europea para la evaluación de medicamentos (EMA) y la FDA (Food and Drugs Administration) exigen una sensibilidad mínima de las técnicas NAT de 100 copias/mL, tanto para el VHC como para el VIH1 (1 UI/mL = 3,8 copias/mL = Eq genómicos de ARN-VHC y 1 UI/mL = 1 copia/mL de ARN-VIH1)^{95, 112}. La sensibilidad mínima para trabajar con donaciones individuales ha sido establecida por el Instituto Paul Ehrlich en 5000 UI/mL para el VHC y en 10000 UI/mL para el VIH1^{112, 113}. La sensibilidad con TMA recientemente publicada es de 26 UI/mL para ARN-VIH1, 4,6 UI/mL para ARN-VHC y 11 UI/mL para ADN-VHB¹¹³.

El Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana ha realizado distintos estudios para evaluar la sensibilidad de distintas tecnologías NAT para la detección de distintos virus en donaciones de sangre (Roche PCR Ampliscreen HIV-1¹¹⁴, la técnica TMA-Chiron HIV1, HCV¹¹⁵, el sistema COBAS s201 TaqScreen MPX Roche¹¹⁶ y el sistema Tigris-Chiron/Gen Probe¹¹⁷, para la detección conjunta de HCV, HIV1 y HBV) lo que ha permitido concluir que las diferencias de sensibilidad entre las técnicas PCR y TMA para la detección de ARN-VHC, ARN-VIH y ADN-VHB son muy pequeñas¹¹⁵⁻¹¹⁸. El Centro de

Transfusión de la Comunitat Valenciana también ha realizado estudios previos a la introducción de la tecnología PCR para su utilización en mezclas de plasma, analizando la carga vírica de donaciones de sangre positivas frente al VHB y VHC y el tamaño de pool adecuado para poderlas detectar^{119, 120}, concluyendo que el tamaño de pool influye en la sensibilidad de la técnica, las cargas víricas de ARN-VHC en donantes con serología positiva son en general elevadas permitiendo su detección en *pools* o mezclas de plasma con un número de unidades de sangre elevado, y que un número considerable de unidades con serología positiva frente al VHB (HBsAg) no se detectarían en *pools* con un número de unidades de sangre elevado (pool de 44 unidades) por lo que para detectar ADN-VHB en unidades de sangre es necesario trabajar en *pools* pequeños (pool de 6-8 unidades) o en muestra individual.

Las limitaciones que se dan en la implantación de las técnicas NAT para el cribado de unidades de sangre son:

1. Automatización incompleta de todo el proceso⁸⁶, aunque desde el año 2006 ya funcionan sistemas integrales que abarcan todas las etapas del análisis NAT (Tigris-Chiron/Gen Probe)¹²¹ y sistemas en que las distintas etapas están automatizadas en distintos aparatos (Cobas s201-Roche)^{116, 122}.

2. Dificultad de realización, con requerimiento de personal especialmente entrenado.

3. Aunque la especificidad es muy alta, cuando se trabaja en minipool o mezclas de plasma, un resultado positivo o un control interno inadecuado obliga a inmovilizar todas las muestras que lo constituyen. Este problema desaparece con la posibilidad de trabajar con muestras individuales como permiten los últimos sistemas automatizados (Cobas s201-Roche, Tigris-Chiron/Gen probe)^{111, 116, 121, 122}.

4. Las pruebas NAT tienen un coste elevado por lo que su implantación debe estar relacionada con estudios de radios de incidencia y riesgo residual en cada población, así como la utilización de técnicas de inactivación vírica y la aplicación de técnicas de detección sensibles, automatizadas y capaces de detectar varios patógenos. Con estas premisas la proporción coste/efectividad puede disminuir y justificar la puesta en marcha de esta tecnología¹²³.

I.2.3. Medidas adoptadas sobre los hemoderivados.

Los distintos componentes sanguíneos o hemoderivados que se obtienen en cada donación de sangre total, que son hematíes, leucocitos, plaquetas y plasma, deberán cumplir unos requisitos para su utilización con fines terapéuticos³¹.

I.2.3.1. Manipulación y preparación correcta.

En la preparación de los distintos componentes sanguíneos se utilizarán recipientes con anticoagulantes y conservantes adecuados que cumplan con el Real Decreto 414/1996 en el que se regulan los productos sanitarios. La separación de los componentes deberá realizarse en condiciones de asepsia y preferiblemente en circuito cerrado, utilizando equipos estériles apirógenos y de un solo uso. Los componentes sanguíneos también se podrán obtener por aféresis, es decir, por el método que mediante el uso de separadores celulares permite la obtención selectiva de uno o más componentes de la sangre del donante y la devolución al mismo de los componentes no seleccionados. Los distintos componentes sanguíneos deberán someterse a diferentes análisis de calidad técnica y se llevará un control bacteriológico apropiado en los procesos de extracción y procesamiento. La conservación y el transporte se realizarán a la temperatura adecuada para los distintos componentes sanguíneos.

1. Hematíes. Los productos utilizados habitualmente son los concentrados de hematíes procedentes de la donación de sangre total tras su separación del plasma mediante centrifugación. Los concentrados de hematíes también pueden obtenerse por una donación de eritroaféresis³³.

Durante una donación de sangre se extraen 450 mL que se recogen en 63 mL de solución conservante CPD (citrato, fosfato, dextrosa). Tras una centrifugación se sedimentan los hematíes en el fondo de la bolsa, se obtiene un sobrenadante claro por encima, el plasma, y una capa leucoplaquetaria entre ambos. A continuación se extrae el plasma y la capa leucoplaquetaria. Por último se añade como solución conservante SAG-Manitol (glucosa, adenina, cloruro sódico y manitol) al concentrado de hematíes, el cual deberá contener un

hematocrito de 55-65 % y un contenido de hemoglobina superior a 40 g. El volumen total del concentrado de hematíes es de 200-300 mL. En la gran mayoría de los centros de transfusión de España se procede a la leucorreducción de los componentes sanguíneos celulares para evitar reacciones febriles, infecciones por virus asociados a leucocitos (citomegalovirus), formación de anticuerpos anti-HLA que provocan la refractariedad plaquetaria y reducir el riesgo de la infección priónica, resultando un contenido leucocitario inferior al millón de elementos por unidad. Los concentrados de hematíes en SAG-Manitol pueden conservarse hasta 49 días a temperaturas de 2 a 6 °C, salvo cuando se indique otra cosa en la etiqueta del producto (hematíes irradiados, hematíes lavados, etc). Los hematíes congelados pueden conservarse durante 30 años dependiendo del procedimiento de extracción, procesamiento y conservación utilizado.

2. Plaquetas. Se obtienen a partir de donaciones de sangre total y según el tipo de fraccionamiento utilizado pueden encontrarse en forma:

-Individual: conteniendo una cantidad de 6×10^{10} plaquetas suspendidas en un volumen de plasma que varía entre 50 y 70 mL. Se mezclan en el momento de la transfusión, precisándose un concentrado individual por cada 10 kg de peso del receptor.

-Mezcla: A partir de la capa leucoplaquetaria obtenida en el fraccionamiento de sangre total de 4 a 6 componentes se consigue una unidad terapéutica de 2.5×10^{11} plaquetas en un volumen de 250-300 mL de plasma o en una solución aditiva para plaquetas con un 30 % de plasma.

Los concentrados de plaquetas también pueden obtenerse a partir de un único donante por aféresis: plaquetoféresis. Deben contener más de $2,5 \times 10^{11}$ plaquetas en un volumen de plasma de 250 mL.

Como en los concentrados de hematíes, en la mayoría de los centros se procede a la leucorreducción de los concentrados de plaquetas.

Independientemente del método de obtención, los concentrados de plaquetas se conservan de 20 °C a 24 °C en agitación continua y pueden conservarse hasta siete días si se combina con un sistema de detección o reducción de contaminación bacteriana. Las plaquetas congeladas pueden conservarse durante un año dependiendo del procedimiento de extracción, procesamiento y conservación utilizado³³.

3. Plasma fresco congelado. Se obtiene a partir de una unidad de sangre total o mediante aféresis de un donante único, tras la separación de los hematíes por centrifugación. Debe congelarse en las horas siguientes de la extracción para asegurar un correcto mantenimiento de los factores lábiles de coagulación. El volumen de plasma obtenido a partir de una donación individual de sangre total es de 200-300 ml, y el plasma obtenido a partir de una plasmaféresis es de 300-600 mL³³. El plasma fresco congelado es la fuente fundamental de obtención de derivados plasmáticos: concentrados de factores de coagulación, albúmina, inmunoglobulinas, etc. La conservación del plasma fresco se realiza a temperatura inferior a -25 °C hasta 24 meses o a -18 °C o inferiores durante seis meses³³.

La OMS y el Consejo de Europa, mediante la resolución WHA 28.72 de 1975³², recomienda que para conseguir una mayor seguridad y control en la utilización de hemoderivados, se ha de lograr el autoabastecimiento de los mismos a partir de donantes altruistas. Siguiendo estas recomendaciones el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana y los demás centros oficiales, realizan contratos con empresas fraccionadoras de plasma, entregando el excedente de plasma fresco que no es requerido por los hospitales. La empresa fraccionadora devuelve el producto final obtenido (albúmina, factores de coagulación, inmunoglobulinas inespecíficas intravenosas, antitrombina III) al centro oficial. A estos acuerdos se les denomina Programas AIPH (Aprovechamiento Integral del Plasma Hospitalario) y comenzaron a realizarse a finales de 1970.

Como se expuso en el punto I.2.2.7, el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana introdujo la técnica de detección del ARN-VHC en todas las donaciones de sangre en julio de 1999, siguiendo primero las recomendaciones del Comité de Especialidades Farmacéuticas de la Agencia Europea del Medicamento en el documento CPMP/BWP/269/95 rev. 2 y de la Guía de Farmacopea Europea, aunque dicha recomendación solo afectaba a las unidades de sangre que se enviaban a la industria fraccionadora para su transformación en hemoderivados. Posteriormente la legislación española, en el Real Decreto 1088/2005, obligó a realizar dicha determinación a todas las unidades de sangre²⁹. La legislación española, desde 1998, establece además, que el plasma fresco congelado se ha de transfundir tras haberle aplicado alguna

medida que aumente la seguridad y se adecue a criterios de eficacia demostrada frente a los riesgos infecciosos de la sangre³¹. Entre estas medidas está someter a cuarentena el plasma durante un tiempo que cubra el periodo ventana habitual de los marcadores de las infecciones víricas o inactivar el plasma mediante técnicas estandarizadas de inactivación de agentes infecciosos.

I.2.3.2. Plasma fresco congelado en cuarentena.

El proceso de cuarentena del plasma consiste en mantenerlo paralizado durante un periodo de tiempo que cubra el periodo ventana habitual de las enfermedades infecciosas transmisibles por transfusión. Este periodo suele ser como mínimo de cuatro meses y se alarga hasta que el donante de sangre realiza una nueva donación. Si esta donación es negativa para todos los marcadores infecciosos, se libera la anterior unidad de la cuarentena. Los principales inconvenientes de este tipo de plasma es que sólo previene de infecciones para los tres virus cribados, VIH, VHC y VHB, no existe un consenso sobre el tiempo de cuarentena utilizado y la utilización del plasma en cuarentena necesita una logística compleja y un sistema de almacenamiento espacioso. La ventaja del plasma en cuarentena al plasma inactivado es que mantiene las proteínas coagulantes en las concentraciones normales, si se siguen los protocolos de obtención adecuados y de congelación en las horas siguientes a la extracción¹²⁴.

I.2.3.3. Plasma fresco congelado solidarizado.

Es la utilización de plasma procedente de las mismas donaciones que los concentrados de hematíes que puede recibir el paciente. Esta modalidad tiene un impacto muy limitado y se precisa de una logística compleja, por lo que en numerosas ocasiones no se puede realizar¹²⁴.

I.2.3.4. Atenuación de la carga vírica.

El objetivo del proceso de la inactivación es destruir o atenuar la carga vírica de los patógenos (virus, bacterias y parásitos) presentes en los

componentes sanguíneos que puedan ser nocivos para el receptor de la transfusión, sin que haya pérdida de la eficacia terapéutica de los mismos ni causar efectos adversos en el receptor. En el plasma fresco congelado el riesgo de contaminación microbiana es muy bajo, ya que bacterias y parásitos mueren por congelación¹²⁵.

La obligatoriedad de inactivar plasma fresco entró en vigor por ley en 1988, siendo empleado en la práctica el método de inactivación fotoquímica con Azul de Metileno, ya que es el único que dispone de autorización ministerial¹²⁴. El Azul de Metileno es un colorante fenotiacínico que mediante una reacción fotodinámica produce radicales de oxígeno y causa la destrucción de los ácidos nucleicos. El método fue desarrollado por la Cruz Roja de Springe (Alemania) y consiste en la adición de una cantidad de Azul de Metileno al plasma y la posterior iluminación con luz blanca. Este colorante tiene especial afinidad por las estructuras de las envolturas de los virus y por los ácidos nucleicos víricos, más concretamente por el par de bases C-G. Posteriormente, por la absorción de un fotón de energía lumínica, el Azul de Metileno sufre una transformación, transfiriendo su energía al oxígeno molecular. Esta molécula transformada en oxígeno molecular produce la destrucción del ARN o ADN vírico. Con este tratamiento se consigue una atenuación de la carga vírica mayor de 5 log para virus encapsulados. Los inconvenientes del empleo de Azul de Metileno son que no tiene efecto sobre virus sin envoltura lipídica, como son el VHA y el parvovirus B19, y se produce una pérdida del orden del 15-37% de factores de coagulación, principalmente de factor VIII y fibrinógeno. La ventaja es que se trata cada unidad de plasma de forma individual¹²⁵.

Otro método de inactivación del plasma fresco congelado es el método de inactivación con Solvente-Detergente: Es un método desarrollado en el New York Blood Center que se ha empleado desde los años 80 para el tratamiento del plasma destinado a la obtención de concentrados de factores de coagulación, fibrina, gammaglobulinas, etc. Se aplica a una mezcla de varios cientos de unidades de plasma y el proceso consta de un tratamiento con solvente orgánico Tri-n-butil-fosfato y un detergente (Triton X-100 o Tween-80) y posterior eliminación del Tri-n-butil-fosfato. Este tratamiento actúa sobre la membrana vírica, destruyéndola. No es eficaz frente a virus sin envoltura¹²⁴.

Hay otros métodos empleados en la elaboración de concentrados de

coagulación que son capaces de reducir la carga vírica como son¹²²:

1. Los tratamientos por calor que desnaturalizan los ácidos nucleicos y proteínas víricas, impidiendo la replicación del virus. Estos tratamientos varían en la temperatura empleada, el tiempo de exposición, presión utilizada y pueden practicarse en estado sólido (seco) o líquido (pasteurización).

2. La nanofiltración y ultrafiltración son técnicas que actúan eliminando los virus con membrana lipídica, los virus sin cubierta. Estas técnicas sólo son eficaces en la purificación de partículas pequeñas, como los factores de coagulación FIX y el FXI, pero son capaces de reducir la concentración de otros agentes infecciosos como los priones¹²⁷.

3. Por técnicas de purificación y formulación de los concentrados de coagulación, como son la separación por cromatografía de inmunoafinidad y cromatografía de intercambio iónico, se eliminan importantes cantidades de virus y de priones^{126, 128}.

Las técnicas de inactivación o reducción de patógenos también se han empezado a aplicar en los concentrados de plaquetas, como son la Riboflavina (vitamina B2) en combinación con luz visible (419 nm) y el Psoraleno S-59. En los concentrados de hematíes hay técnicas que están en fase avanzada de investigación, como son Inactine (PEN 110) y el FRALE S-303¹²⁵. En conclusión los tratamientos de inactivación de los componentes sanguíneos “ideales” deben ser válidos para todos los agentes infecciosos (bacterias, parásitos, virus, priones) deben reducir la población de células linfocitarias sin dañar las demás células sanguíneas ni las proteínas plasmáticas y estar preferiblemente automatizadas con un coste adecuado. Por último el agente de inactivación debe poder eliminarse fácilmente o ser mínimamente tóxico para el receptor¹²⁵.

I.2.4. Medidas en relación con el receptor.

La administración de componentes sanguíneos se realizará por prescripción médica. El receptor será informado de los beneficios y riesgos de la transfusión y de las posibles alternativas y dará su conformidad según lo establecido en la Ley 41/2002 donde se regula la autonomía del paciente y de los derechos y obligaciones en materia de la información y documentación clínica.

Se solicitará la transfusión identificando al receptor y al médico que prescribe la transfusión y las razones médicas de la indicación. Se realizarán las pruebas de compatibilidad en el receptor, excepto en los casos de requerimiento urgente que comprometa la vida del paciente. Antes de la transfusión se comprobará la identificación del paciente y los datos de identificación de la unidad de sangre o componente sanguíneo destinado para él. Se verificarán las pruebas de compatibilidad y se comprobará el grupo sanguíneo del paciente y de la unidad de sangre. También se comprobará la caducidad de la unidad de sangre y se anotará en la historia clínica del paciente para garantizar la trazabilidad donante-receptor. El centro que distribuya los componentes sanguíneos y los servicios de transfusión que los administren deben cumplir procedimientos que garanticen la identificación de las muestras analizadas y el destino final de cada unidad distribuida³¹.

I.3. El riesgo residual de transmisión del VHC por hemoderivados.

I.3.1. Definición del riesgo residual.

El riesgo residual es el riesgo de transmisión de infecciones por transfusión de hemoderivados que han sido sometidos a pruebas de cribado en un momento dado^{3,4}.

I.3.2. Causas del riesgo residual.

Hay al menos cuatro causas que explican el riesgo residual^{4, 40}:

1. Que el donante se encuentre en una fase inicial de infección, durante el denominado periodo ventana serológica, en el que su sangre puede transmitir una infección pero los resultados de las pruebas serológicas de cribado son negativas.

2. La existencia de portadores crónicos, en que un donante infectado pero clínicamente asintomático tiene resultados constantemente negativos en las pruebas serológicas de cribado.

3. La existencia de agentes infecciosos con mutaciones en su genoma, en

un grado suficiente para hacer que sean indetectables por las pruebas de cribado diseñadas para el agente prototipo.

4. Probabilidad de error de laboratorio en la realización de las pruebas de cribado, si bien en la actualidad este tipo de error ocurre muy raramente y puede oscilar alrededor de un 0.5 %¹²⁹.

Hay otras variables que deben ser tenidas en cuenta en la estimación del riesgo residual:

1. La cantidad media de hemoderivados obtenidos de cada unidad de sangre¹²⁹.

2. El número de donantes diferentes de los que se transfunde sangre a cada receptor o cuántos donantes intervienen en la fabricación de un componente sanguíneo (hasta 5 donantes en un concentrado de plaquetas y hasta 10000 donantes en un crioprecipitado de factor VIII)¹²⁹.

3. Entre el 25 % y el 50 % de los receptores de hemoderivados fallecen a lo largo del primer año después de la transfusión por causas ajenas a ésta, antes de que pueda diagnosticarse una infección transmitida por la sangre¹²⁹.

4. Al estimar el riesgo a partir de un gran número de donantes procedentes de regiones geográficas diferentes, por una parte los datos son más fiables, pero por otra, se está obteniendo un promedio entre zonas en las que el riesgo puede ser prácticamente nulo y otras en las que puede ser muy superior a la media obtenida¹²⁹.

I.3.3. Cálculo del riesgo residual.

En un principio los riesgos de infección por transfusión podían medirse por el porcentaje de receptores infectados. El descenso del riesgo de infección asociada a transfusión con la introducción de pruebas de cribado más específicas y sensibles ha dado lugar a un aumento considerable en la complejidad de los cálculos necesarios para estimar dicho riesgo, obligando a desarrollar distintos modelos estadísticos basados en la incidencia y el periodo ventana de cada infección^{2, 3, 4, 9, 130, 131}.

Para la aplicación de los diferentes modelos estadísticos para el cálculo del riesgo residual de una infección es necesario el análisis de distintos

parámetros:

1. Tasa de incidencia de infección.

La incidencia es el número de casos nuevos que surgen en una población en un momento determinado. Los casos que aparecen o se diagnostican a lo largo de un estudio en personas que al comienzo del estudio estaban sanas son casos incidentes.

La magnitud que expresa la incidencia es la tasa de incidencia o densidad de incidencia, que es el número de casos nuevos que ocurren por unidad de población-tiempo.

Las tasas de incidencia son medidas que expresan el cambio de una magnitud por unidad de cambio de otra magnitud y siempre tienen una dimensión temporal. Por tanto, la tasa de incidencia no significa número de casos nuevos ocurridos en el año, sino que expresa la velocidad con que se produce la enfermedad en una población.

La unidad de población-tiempo o personas-tiempo es una medida de la población que está en riesgo y se obtiene sumando el tiempo que cada individuo ha estado expuesto al factor objeto de estudio o multiplicando el número de individuos incluidos en el estudio por la media del tiempo de observación¹²⁸.

La tasa de incidencia (I), que es la medida fundamental de frecuencia de la enfermedad, se define como:

$$I = C / T; \text{ donde}$$

C: número de casos de factor objeto de estudio (enfermedad) que aparecen en una población durante un periodo de tiempo determinado.

T: tiempo en riesgo, que es la suma de los periodos de tiempo correspondientes a cada individuo de la población en riesgo de presentar la enfermedad o factor de estudio.

El tiempo en riesgo para cada individuo es el tiempo durante el cual permanece en el grupo de estudio y se encuentra libre de la enfermedad, con lo que presenta el riesgo de contraerla. El valor total del tiempo en riesgo se puede calcular de forma aproximada multiplicando el tamaño medio de la población por la duración del periodo de observación. La dimensión de la tasa de incidencia es la inversa de la unidad de tiempo (1 / T). El intervalo válido de la tasa de incidencia no puede ser inferior a cero y teóricamente no tiene límite superior¹²⁹.

2. Prevalencia de una infección.

La prevalencia es la proporción de casos existentes en una población en un momento determinado, entendiendo como proporción una razón o cociente en el que el numerador se encuentra incluido en el denominador. Por tanto, se consideran casos prevalentes los casos ya existentes o que ya tenían la enfermedad o factor al comienzo del estudio¹³².

La prevalencia (P) se define como:

P = CA/PA; siendo

CA: nº de individuos que presentan la enfermedad (VHC) o factor objeto de estudio en un momento dado.

PA: nº de individuos de la población en ese momento.

La prevalencia (P) depende de la incidencia (I) y de la duración de la enfermedad (D). En una situación estable, esta asociación puede expresarse como:

$$\mathbf{P / (1-P) = I \times D}$$

Para enfermedades o rasgos raros, es decir de baja prevalencia, puede utilizarse la aproximación:

P = I x D; ya que el denominador de la parte izquierda de la ecuación anterior, que refleja la parte de la población que está libre de la enfermedad o factor, tiene un valor muy próximo a 1, por ser el valor P muy pequeño¹³³.

En estos casos la prevalencia y la incidencia son directamente proporcionales y se puede asumir que si en una población concreta (por ejemplo donantes nuevos) la prevalencia de marcadores de enfermedades infecciosas es mayor que en otra población (por ejemplo donantes repetidores), la incidencia también será mayor⁴⁰.

La prevalencia informa sobre la proporción de personas que tienen una determinada característica (por ejemplo presencia de anticuerpos frente al VHC) en un momento dado, pero no proporciona información alguna sobre cuándo se ha producido la adquisición de esa característica⁴⁰.

Los donantes de sangre que representan casos prevalentes de las principales enfermedades asociadas a transfusión, no constituyen una fuente apreciable de riesgo, ya que su condición es detectada en la inmensa mayoría por las pruebas de cribado y sus donaciones son desechadas.

La principal causa de transmisión de infecciones por transfusión se debe a

donaciones efectuadas en fases iniciales de la infección, durante el periodo de ventana serológica, es decir, el riesgo residual se debe a los donantes que representan casos incidentes de infección, por lo que la medida de frecuencia de la enfermedad que debe utilizarse para la estimación del riesgo es la tasa de incidencia de infección^{40, 70, 129}.

3. Duración del periodo ventana.

Se utilizan los datos proporcionados por la bibliografía citada⁷⁰, expresados como fracción de año y que fueron expuestos en el punto I.2.2.3 de la introducción de esta tesis.

4. Riesgo residual de transmisión de una infección.

El cálculo se obtiene multiplicando la tasa de incidencia de la infección por la duración media de su periodo ventana. La tasa de incidencia se refiere a cien mil personas y se expresa como cien mil personas/año. La duración media del periodo ventana se expresa como fracción de año y el riesgo se refiere a un millón de unidades de sangre transfundidas.

Los cálculos del riesgo de infección por transfusión se expresaban como proporción de receptores infectados, haciendo difícil comparar el riesgo de receptores expuestos a diferente número de transfusiones. Los nuevos modelos estadísticos para la obtención del riesgo residual, en los que dicho riesgo se expresa por número de unidades, presentan la ventaja de poder calcular el riesgo total de distintos receptores en función del número de transfusiones recibidas por cada uno. Para ello basta con multiplicar el riesgo por millón de unidades por el número de unidades transfundidas a cada receptor⁴⁰.

I.3.3.1. Métodos tradicionales para el cálculo del riesgo de infección.

Podemos diferenciar tres métodos⁴:

1. Estudios prospectivos de pacientes transfundidos.

a. Seroconversión de receptores. Estos estudios sólo pueden realizarse cuando el riesgo, el número de receptores y el número de componentes transfundidos son elevados¹³⁴.

b. Detección de infección en muestras de donantes analizadas por

métodos más sensibles a los utilizados previamente¹³⁰.

2. Investigación retrospectiva o *look-back* de componentes sanguíneos procedentes de donantes que han seroconvertido. Uno de los principales inconvenientes de este método es que sólo a una parte de los receptores se les puede realizar las pruebas necesarias para determinar si han sido infectados^{131, 135}.

3. Registro de receptores de hemoderivados afectados de una infección en bases de datos nacionales¹³⁶.

I.3.3.2. Métodos basados en modelos epidemiológicos.

Los métodos tradicionales han dado paso a métodos estadísticos de estimación del riesgo, debido a que el riesgo de infección ha disminuido mucho con la introducción de técnicas de cribado más sensibles y específicas.

En estos métodos se pueden diferenciar dos tipos de modelos estadísticos, los que tienen en cuenta el riesgo debido tanto a donantes habituales como a donantes nuevos y los que tienen en cuenta el riesgo que representan sólo los donantes habituales. Los datos obtenidos del riesgo de transmisión de una determinada enfermedad infecciosa por transfusión con los diferentes métodos, se pueden comparar teniendo en cuenta el momento en que se realizaron los estudios, en función del cual varían las pruebas de cribado utilizadas y también la incidencia y prevalencia de la enfermedad infecciosa estudiada en la población de donantes².

I.3.3.2.1. Modelo de los Centros para el Control de Enfermedades y Cruz Roja Americana.

Es un modelo que tiene en cuenta el riesgo debido tanto a donantes habituales como a donantes nuevos¹³⁷. Se desarrolló en Estados Unidos y en este modelo se basó el primer trabajo de cálculo del riesgo de infección de VIH por transfusión, en que se tuvo en cuenta el riesgo que representan las donaciones procedentes de donantes habituales. Este trabajo sirvió de base para otros posteriores.

Este modelo tiene en cuenta los siguientes datos:

1. El número de componentes sanguíneos transfundidos anualmente.
2. El porcentaje de estos componentes que corresponden a donantes habituales y a donantes nuevos.
3. La incidencia de la enfermedad en donantes habituales.
4. La prevalencia en donantes nuevos.
5. El periodo ventana de la infección y el intervalo medio de donaciones en donantes habituales.
6. Asume que la sensibilidad de las pruebas utilizadas es del 99 %, por lo que hay un 1% que no se detecta.
7. El riesgo total es igual a la suma del riesgo correspondiente a donantes repetidores más el correspondiente a los donantes nuevos.

I.3.3.2.2. Modelo del Grupo para el Estudio de la Epidemiología de Retrovirus en Donantes (REDS). Variables críticas del mismo.

Es un modelo basado en la incidencia y el periodo ventana, aplicado a las donaciones efectuadas por donantes habituales^{3, 40, 70-72, 138-140}. Según este modelo, el riesgo de transmisión de una infección es igual a la tasa de incidencia por cien mil personas-año de esa infección, multiplicada por la duración del periodo ventana expresada como fracción de año y por diez, para referir el riesgo a un millón de donaciones.

a. El numerador de la tasa de incidencia es el número de donantes repetidores que seroconvierten para el marcador de la infección durante el periodo considerado.

b. El denominador de la tasa de incidencia es el número de persona-años en riesgo de contraer la infección. Este denominador se obtiene sumando los intervalos entre la primera y última donación de todos los donantes habituales durante el periodo de tiempo considerado, mediante un programa informático que realice esta operación a partir de los datos demográficos del donante. También se puede obtener multiplicando el número de donantes habituales por la media del intervalo entre donaciones de estos donantes durante el periodo de tiempo considerado. El valor medio del intervalo se puede obtener con el 5 % de los donantes que se ha podido calcular¹⁴¹ y también se puede obtener a partir de un

número reducido de donantes (400 donantes) con una precisión que puede modificar el valor final del riesgo en +/- 5 % del valor que se obtendría calculando el denominador de la tasa de incidencia a partir del número total de donantes. Así se obtiene la tasa cruda de incidencia.

c. Para obtener la tasa corregida de incidencia se excluyen del numerador los donantes cuya donación anterior a la seroconversión fue desechada por otra prueba distinta a aquélla para la que han seroconvertido (falsos positivos en otras pruebas de cribado, ALT elevadas, autoexclusión del donante) y se vuelve a calcular el número de personas-año en riesgo, teniendo en cuenta sólo los donantes cuya donación anterior a la donación fue apta y asumiendo que las seroconversiones se producen en la mitad del intervalo entre la última donación apta y la donación en la que se detecta la seroconversión. Este valor de la tasa de incidencia es el que se utiliza para multiplicarlo por la duración del periodo ventana de cada infección y así obtener el riesgo residual.

d. Para el cálculo de la tasa de incidencia de infección por VHB hay que realizar una corrección adicional, considerando los tres posibles tipos de respuesta clínica que da lugar esta infección en sus fases iniciales¹⁴².

d.1. Infección crónica: Personas que presentan antígeno de superficie VHB (HBsAg) durante largos periodos de tiempo (portadores crónicos). Esta circunstancia se da en el 5% de los adultos recientemente infectados.

d.2. Respuesta de anticuerpos primaria: Personas que fueron infectadas pero no desarrollaron nunca niveles detectables de HBsAg. Este tipo de respuesta se da en el 25% de los casos.

d.3. Antigenemia transitoria: Personas que presentan niveles detectables de HbsAg durante cortos periodos de tiempo. Esta respuesta se da en el 70% de los casos.

La probabilidad de que un donante infectado por el VHB sea detectado mediante la prueba de cribado para detectar HBsAg es 1.0 en el caso de los portadores crónicos, de 0.0 en el caso de los donantes con respuesta de anticuerpos primaria y una probabilidad desconocida (T) en el caso de los donantes con antigenemia transitoria. Por lo tanto la probabilidad de que un donante de sangre recientemente infectado por VHB presente un resultado positivo en la prueba de cribado de detección de HBsAg es:

$$P = (5\% \times 1.0) + (25\% \times 0.0) + (70\% \times T)$$

La probabilidad en el caso de los donantes con antigenemia transitoria (T) vendrá dada por la división de dos variables:

1. La duración del periodo de la antigenemia transitoria, donde el resultado de HBsAg es positivo. Se ha estipulado en 63 días, basándose en otros estudios¹³⁸

2. El intervalo entre la última donación seronegativa y la donación HBsAg positiva de los donantes repetidores con infección incidente por VHB durante el periodo de estudio o mediana del intervalo entre donaciones de los donantes que seroconvierten para HBsAg.

La probabilidad de detectar a los donantes con infección incidente por VHB es P, por lo que $1 / P$ será la probabilidad de no detectarlos. La probabilidad de no detectarlos ($1 / P$) es la cantidad por la que se multiplica la tasa de incidencia de infección por VHB para obtener la tasa corregida de incidencia para el VHB.

e. La duración del periodo ventana se obtiene a partir de los datos reportados en la bibliografía.

Las limitaciones de este modelo son⁷⁰.

1. No tiene en cuenta el riesgo de las donaciones procedentes de donantes nuevos.

2. Los valores de la duración de los periodos ventana, que dependen de la sensibilidad de las técnicas de detección empleadas.

3. No refleja la posible contribución al riesgo de infecciones crónicas seronegativas y en algunos estudios están realizados con el 10 % de todos los donantes de un país.

I.3.3.2.3. Otros modelos.

1. Modelos de cálculo del riesgo basados en donantes habituales y donantes nuevos.

1.1. Método desarrollado en Estados Unidos a partir del modelo de los Centros para el Control de Enfermedades y Cruz Roja Americana¹⁴³, que calcula el riesgo multiplicando el número de unidades transfundidas anualmente por la media ponderada de la tasa anual de unidades infecciosas y no detectadas por

millón de donaciones, procedentes de seis subpoblaciones de donantes, resultantes de considerar separadamente a hombres y a mujeres:

- a. Donantes nuevos.
- b. Donantes repetidores no analizados previamente para los marcadores infección.
- c. Donantes repetidores que tienen resultados previos para esta prueba.

1.2. Modelo desarrollado en Alemania y Austria a partir de los modelos anteriores^{134, 139, 144}. Este modelo considera que el riesgo se debe a tres causas:

- a. Donación en periodo ventana.
- b. Resultado falso negativo por baja sensibilidad de la técnica utilizada.
- c. Error de laboratorio.

El riesgo total es la suma de los riesgos parciales debidos a cada una de las causas anteriores, considerados separadamente para donantes repetidores y nuevos y teniendo en cuenta el número de donaciones que realiza cada grupo de donantes.

1.3. Método realizado en Francia que tiene en cuenta los siguientes datos¹⁴⁵:

a. El número de donantes que han seroconvertido para una enfermedad en un año.

b. Se le restan los donantes que han efectuado donaciones que no han sido utilizadas para la elaboración de componentes lábiles, o sea, donaciones de plasmaféresis o con marcadores positivos.

c. Al número de donantes obtenido, se le restan los donantes para los que el tiempo transcurrido entre la seroconversión y la última donación seronegativa ha sido superior a doce meses.

d. Este nuevo número se divide por 4, considerando que sólo la cuarta parte de los donantes que han seroconvertido en el último año son realmente infecciosos.

e. El número de donantes así obtenido se divide por el número de donaciones efectuadas por los donantes habituales en el mismo año, obteniéndose el riesgo de transmisión de la enfermedad debido a donantes repetidores.

f. El riesgo que representan los donantes nuevos se obtiene a partir de la comparación de las tasas de seropositividad y la proporción de seroconversiones recientes entre donantes habituales y donantes nuevos.

1.4. Método desarrollado en Estados Unidos¹²⁹ en el que el riesgo de transmisión de la enfermedad por transfusión de sangre seronegativa es igual a la probabilidad de donación en periodo ventana, mas la proporción de donaciones positivas consideradas negativas por un error de laboratorio, menos la proporción de donaciones infecciosas desechadas por resultado positivo en otra prueba de laboratorio.

a. La probabilidad de una donación en periodo ventana se obtiene multiplicando la tasa de incidencia entre donantes repetidores y nuevos por la duración del periodo ventana. La tasa de incidencia se calcula como media ponderada de la tasa de incidencia en donantes habituales y nuevos.

b. La proporción de donaciones positivas consideradas negativas debido a un error de laboratorio se obtiene multiplicando la probabilidad estimada de un error de laboratorio por la seroprevalencia de la infección estudiada.

c. La proporción de donaciones con marcadores para la prueba de cribado positivos desechadas por el resultado de otra prueba de laboratorio.

2. Modelos de cálculo del riesgo basados en donantes repetidores.

Otro modelo que se ha utilizado para el cálculo de la probabilidad de donación en periodo ventana basado en las donaciones de donantes repetidores es el siguiente¹⁴⁶:

$$p = (s (wp / i)) / n; \text{ donde}$$

p: es la probabilidad de donación en periodo ventana

s: es el número de donantes que han seroconvertido

wp: es la duración de periodo ventana en días

i: es la mediana del intervalo entre la donación positiva y la anterior negativa

n: es el número de donaciones de donantes repetidores.

I.3.4. Situación actual del riesgo de transmisión del VHC por hemoderivados.

La aplicación del modelo del cálculo del riesgo residual basado en la incidencia y el periodo ventana se permite disponer de datos sobre el riesgo residual de infección de las enfermedades transmisibles por transfusión y conocer la situación actual de dichas enfermedades para poder compararla con la

de otros países, y así disponer de una base sobre la que planificar la implantación de nuevas medidas para obtener hemoderivados más seguros.

Como se expuso en el apartado I.2.2.3, la puesta en marcha de las diferentes pruebas de cribado para la detección de los distintos marcadores infecciosos del VHC, han ido aumentando la sensibilidad de las técnicas y reduciendo el periodo ventana de la infección. De este modo, actualmente, el riesgo de transmisión del VHC es muy bajo debido a que en julio de 2006 se introdujo como prueba de cribado la determinación del ARN-VHC mediante técnicas NAT en muestra individual, reduciéndose el periodo ventana a tan sólo siete días⁶². Además las técnicas de inactivación del plasma, que son muy eficaces en la reducción y destrucción de virus con cubierta, como es el VHC, o la cuarentena del plasma, garantizan la seguridad del mismo.

I.3.5. Repercusión de la introducción de nuevas pruebas de cribado sobre el riesgo residual.

La introducción de nuevas pruebas de cribado, especialmente de las basadas en técnicas de biología molecular, ha servido como comprobación de las estimaciones del riesgo según los distintos modelos.

El rendimiento de una prueba nueva, referido habitualmente a diez millones de unidades, o casos de infección asociada a transfusión que se evitarían con la introducción de esa nueva prueba por cada diez millones de unidades transfundidas, se calcula multiplicando la tasa corregida de incidencia por el número de días de reducción del periodo ventana, expresados como fracción de año, que se consigue con la prueba de cribado nueva⁴⁰.

Rendimiento (por 10^6 unidades)=Tasa corregida de incidencia x reducción del periodo ventana (expresado en fracción de año) o también mediante la diferencia entre el riesgo residual obtenido teniendo en cuenta el periodo ventana serológico asignado a las pruebas serológicas de cribado en el periodo de estudio y el riesgo residual obtenido teniendo en cuenta el periodo ventana correspondiente a la prueba NAT de cribado en ese periodo de estudio:

$$R (\text{por } 10^6 \text{ unidades}) = RR_{\text{SERO}} - RR_{\text{NAT}}$$

El rendimiento anual de un nuevo método, expresado como donaciones o componentes sanguíneos potencialmente infecciosos que dejarían de

transfundirse al introducirse dicho método, se calcula multiplicando el rendimiento obtenido como se ha expuesto antes por el número de donaciones o componentes sanguíneos transfundidos:

Rendimiento anual de un método nuevo = rendimiento (por 10ⁿ unidades) x número de donaciones.

II. OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo están enfocados al estudio de las pruebas analíticas para la detección del VHC y al estudio epidemiológico de dicha infección en los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana entre 1990 y 2002, siendo los siguientes:

1. Determinar la especificidad de las pruebas serológicas de cribado.
2. Valorar los resultados de las pruebas serológicas de confirmación.
3. Valorar la utilidad de la determinación de la concentración de la actividad ALT como marcador indirecto de infección por VHC en donantes de sangre.
4. Determinar la prevalencia anual de infección por VHC en los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana durante el periodo 1991-2002.
5. Estimar de las tasas crudas y corregidas de incidencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana durante los periodos 1990-1992, 1993-1995, 1996-1998, 1997-1999 y 2000-2002.
6. Estimar del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana durante los mismos periodos de estudio.
7. Estimar la reducción del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados con la introducción de nuevas pruebas de cribado.
8. Valorar la implantación de las pruebas basadas en la tecnología NAT para la detección del VHC en el cribado de las donaciones de sangre en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Material.

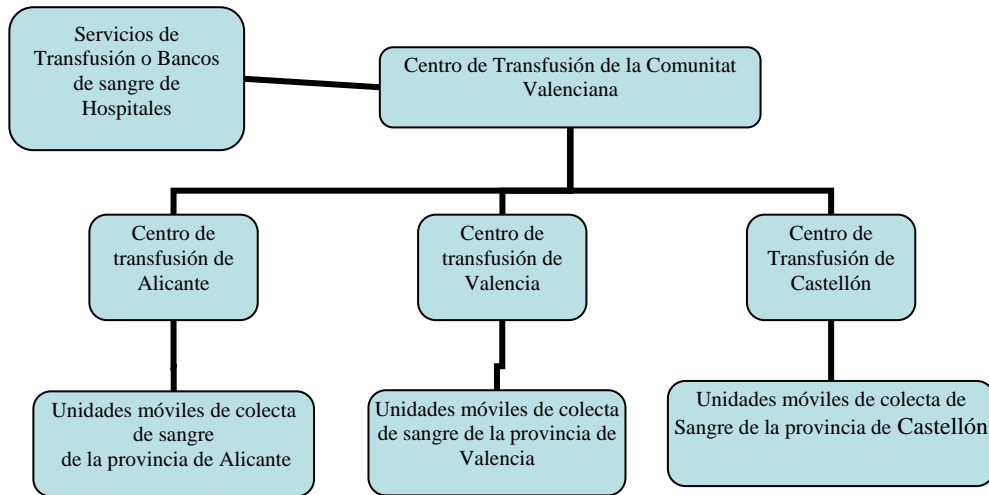
III.1.1. Organización de la donación de sangre en la Comunitat Valenciana. Centros de Transfusión.

La organización de la hemodonación y los bancos de sangre o servicios de transfusión se ha ido regulando con diferentes Reales Decretos y Directivas Europeas, siguiendo las recomendaciones realizadas por la Comisión Nacional de Hemoterapia y los organismos internacionales competentes.

En la Comunitat Valenciana tanto la extracción y verificación de la sangre humana o sus componentes como el procesamiento, almacenamiento y distribución de los mismos a los distintos hospitales públicos y privados, se realiza en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, el cual forma parte de la Agència Valenciana de Salut de la Conselleria de Sanitat de la Generalitat Valenciana y de la red de centros y servicios de transfusión (Real Decreto 1277/2003).

El Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana fue inaugurado el 20 de mayo de 1987 y está constituido por tres delegaciones provinciales (Valencia, Alicante y Castellón). Todas las delegaciones disponen de la tecnología y personal adecuado para realizar las funciones de extracción, fraccionamiento y distribución de los hemoderivados. Los centros de Alicante y Valencia, además disponen de la infraestructura necesaria para realizar el análisis de grupo sanguíneo, serológico e inmunohematológico de las unidades de sangre. Cada centro de transfusión dispone de una red de unidades móviles que se desplazan a los distintos puntos provinciales para realizar las colectas de sangre, llevando las unidades de sangre a cada centro de transfusión. Aparte de los centros de transfusión, la colecta de sangre se realiza en los servicios de transfusión o bancos de sangre de cada hospital, los cuales remiten las unidades de sangre a los centros de transfusión para su análisis y fraccionamiento en los distintos hemoderivados. La donación de sangre es altruista y voluntaria, y según las directrices del Consejo de Europa (381/89) se ha de llegar a un índice de donación idóneo para alcanzar el nivel de autosuficiencia en todos los productos sanguíneos.

Esquema 1: Organización de la colecta de sangre en los centros de transfusión de la Comunitat Valenciana.



III.1.2. Sistemas de registro de la información demográfica y de la información relativa a enfermedades infecciosas detectadas en donantes.

III.1.2.1. Sistema informático.

En este trabajo, se han utilizado cuatro sistemas informáticos para el tratamiento de los datos:

1. Base de datos (IMAGE 250/260) del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, obtenida mediante el programa de Banco de Sangre SYSBANK modificado por el servicio de informática del Centro de Transfusión (BDS), el cual utiliza el sistema operativo UNIX, y en la que se registran todas las donaciones realizadas por los donantes de sangre. Con este sistema se han obtenido:

a. Las fichas de los donantes de sangre con todos los datos de sus donaciones. Las donaciones realizadas antes de 1992 están depuradas, por lo que los resultados analíticos de dichas donaciones no están en las fichas de los donantes de sangre, aunque se han conservado en papel. El primer intervalo de estudio empieza en febrero de 1990, que es cuando se inició la determinación de

la prueba de cribado para la detección de anticuerpos anti-VHC.

b. Los listados con el número de donantes repetidores, cuya primera donación fue apta, a los que corresponde un intervalo dado entre donaciones, durante los periodos de estudio considerados 1990-1992; 1993-1995; 1996-1998 y 1997-1999.

c. Los listados con el número de donantes repetidores a los que corresponde un intervalo dado entre donaciones, cuya primera donación no fue apta, durante los periodos de estudio considerados: 1990-1992; 1993-1995; 1996-1998 y 1997-1999.

d. Hoja de cálculo mediante el programa EXCEL de Microsoft, para obtener la suma de los productos del número de donantes por cada intervalo entre donaciones, que es la cantidad total de donante-años en riesgo.

e. Listado de donantes con alguna donación excluida por algún marcador serológico positivo (VHB, VIH, VHC, Sífilis) en el periodo 1990-1998 del Centro de Transfusión de Valencia y Castellón.

2. Programa informático desarrollado por el Centro de Transfusión de Granada-Almería en el que se integraron los archivos de la base de datos de las donaciones de sangre realizadas en el periodo 2000-2002. Con este programa se calculó el número de donantes que habían realizado, al menos, dos donaciones durante el periodo de estudio (donantes repetidores), las donaciones realizadas por éstos y la suma de los intervalos entre la primera y la última donación de todos los donantes repetidores, para obtener el número de donante-años en riesgo en el periodo 2000-2002.

3. Programa informático COGNOS de Inmucor del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. Este programa se ha empleado para determinar el número de las donaciones de sangre, de los donantes nuevos y de los donantes repetidores por año, en todo periodo de estudio (1990-2002).

4. Programa Hematos II G de Inmucor, que ha sustituido el programa BDS, en el que quedan registrados todas las donaciones realizadas por los donantes de sangre.

III.1.2.2. Sistemas manuales de registro.

El sistema de registro de las unidades de sangre procesadas para la detección de los marcadores infecciosos, que se ha utilizado en el laboratorio de serología del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, aparte del registro informático, consta de los siguientes documentos:

a. Libro de laboratorio de los marcadores serológicos, donde se registra el número de unidades de sangre procesadas en el día y se anotan los lotes o grupos de unidades de sangre con números consecutivos. En esta libreta se anotan las unidades inicialmente reactivas a los distintos marcadores infecciosos, las repeticiones hechas a las mismas y las unidades que quedan pendientes.

b. Libro de laboratorio de las unidades de sangre procesadas en mezclas de plasma para la detección de ARN-VHC, donde se registra el número de mezclas de plasma procesadas en el día y la composición de las mismas. Se anotan las unidades inicialmente positivas procesadas de forma individual y las unidades de sangre pendientes.

c. Libro de repeticiones, donde se registran las unidades de sangre que son repetidamente reactivas a los marcadores infecciosos, de las cuales se guarda una alícuota de suero para hacer las pruebas de confirmación. En este libro se anota también el resultado de dichas pruebas.

d. Archivos de cada marcador infeccioso con los resultados de las pruebas de cribado.

e. Álbumes para las pruebas de confirmación de VIH y VHC, donde se guardan las tiras de nitrocelulosa de los inmunoanálisis.

f. Archivos para cada marcador infeccioso, con las historias clínicas de los donantes a los que se ha realizado alguna prueba de confirmación.

g. Memorias anuales del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, de las que se ha extraído el número anual de donaciones de sangre, el número de determinaciones de ALT realizadas y los datos demográficos de la población de donantes de sangre (sexo e intervalo de edades).

III.1.3. Perfil de los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana.

Para determinar las características de la población de donantes de sangre de la Comunitat Valenciana entre 1990 y 2002 se han estudiado las siguientes variables: sexo y grupos de edades.

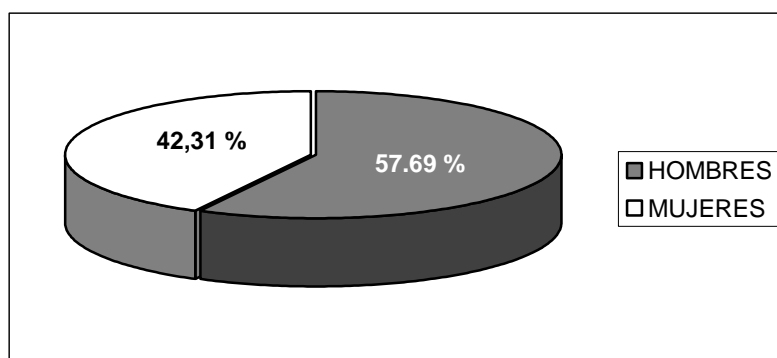
La distribución por sexos, se muestra en la tabla 10:

Tabla 10: Distribución de los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana por sexos.

AÑO	Nº donantes	Hombres (%)	Mujeres (%)
1990	62815	60.40	39.60
1991	71918	60.15	39.85
1992	80578	58.55	41.45
1993	84353	58.20	41.80
1994	85543	57.85	42.15
1995	86690	57.70	42.30
1996	92715	57.80	42.20
1997	97990	57.90	42.10
1998	101412	57.10	42.90
1999	103875	56.50	43.50
2000	107667	56.10	43.90
2001	107487	55.82	44.18
2002	113207	55.88	44.12

En el periodo 1990-2002, la media de distribución relativa de los donantes de sangre en hombres fue de $57,69 \% \pm 1,40 \%$ y de $42,31 \% \pm 1,40 \%$ la de las mujeres, como se muestra en la gráfica 1:

Gráfica 1: Distribución por sexos de los donantes de sangre



En este periodo de estudio, la proporción de donantes de sangre varones ha sido mayor que la proporción de mujeres, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

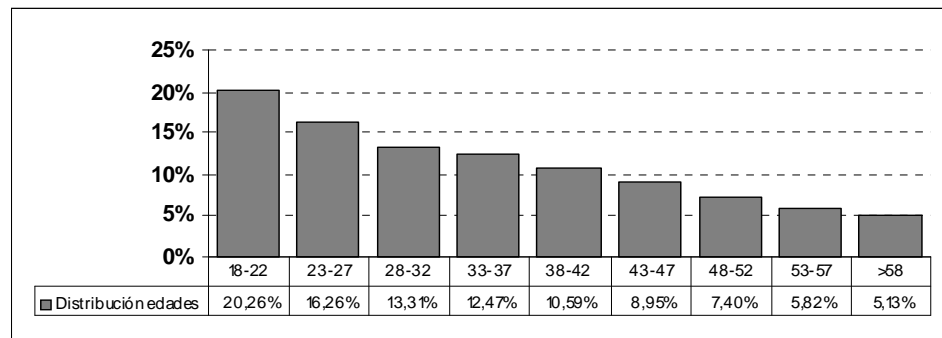
La distribución por grupos de edades se expone en la tabla 11:

Tabla 11: Distribución relativa de los donantes de la Comunitat Valenciana por grupos de edad.

AÑO	Nº donantes	18-22 (%)	23-27 (%)	28-32 (%)	33-37 (%)	38-42 (%)	43-47 (%)	48-52 (%)	53-57 (%)	>58 (%)
1990	62815	17.80	15.25	12.90	11.30	10.80	10.00	8.10	7.75	6.10
1991	71918	21.40	14.95	12.50	11.10	10.10	9.60	7.90	6.75	5.70
1992	80578	20.65	15.45	13.00	11.30	9.90	9.50	8.20	6.05	5.95
1993	84353	22.30	16.20	13.20	11.30	9.40	8.75	7.40	5.90	5.55
1994	85543	21.80	16.65	13.15	11.70	9.65	8.45	7.40	5.55	5.65
1995	86690	22.25	16.85	12.70	11.65	9.55	8.40	7.50	5.40	5.70
1996	92715	22.60	17.00	12.95	12.05	9.70	8.00	7.20	5.45	5.05
1997	97990	22.75	16.65	12.95	12.00	10.00	7.95	7.05	5.70	4.95
1998	101412	22.00	16.80	12.85	12.45	10.50	8.30	7.05	5.50	4.55
1999	103875	20.64	17.19	14.26	14.34	10.51	7.76	6.54	4.88	3.90
2000	107667	21.34	17.34	14.54	14.39	10.61	9.12	6.26	4.56	3.51
2001	107487	15.86	16.19	13.58	13.01	12.59	9.79	7.55	6.24	5.17
2002	113207	12.03	14.97	14.49	15.51	14.32	10.68	8.10	5.93	4.97

La media de la distribución relativa de los donantes de sangre por edades en el periodo 1990-2002 se muestra en la gráfica 2:

Gráfica 2: Distribución relativa de los donantes de sangre por edades.



III.1.4. Número de donaciones anuales en el periodo 1990-2002 en los Centros de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

El número de donaciones anuales en el periodo de estudio 1990-2002 ha sido obtenido de las memorias anuales del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. En la tabla 12 se muestra el número de donaciones anuales en las tres provincias de la Comunitat Valenciana.

Tabla 12: N° de donaciones de sangre anuales en el periodo 1990-2002

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° donaciones Castellón, Valencia	65003	74588	84331	94778	91329	91125	97332	102075	106091	112955	115694	115005	120835
N° donaciones Alicante	29395	34157	38149	37841	39672	41633	40458	42433	43778	43810	47126	49133	51880
N° donaciones totales	94398	108745	122480	132619	131001	132758	137790	144508	149869	156765	162820	164138	172715

III.1.5. Número anual de donantes de sangre durante el periodo de tiempo considerado.

El presente estudio comprende el tiempo que transcurre entre el año 1990 y el año 2002, dividido en periodos de tres años:

- 1º) Febrero de 1990- diciembre de 1992.
- 2º) Enero de 1993- diciembre de 1995.
- 3º) Enero de 1996- diciembre de 1998.
- 4º) Enero de 1997- diciembre de 1999.
- 5º) Enero de 2000- diciembre de 2002.

El número anual de donantes de sangre comprende tanto donantes repetidores como donantes nuevos. Estas cantidades las hemos obtenido mediante el programa informático COGNOS de Inmucor. Dentro de los donantes repetidores, se distingue entre los donantes conocidos y donantes habituales (los donantes conocidos son los que han donado sangre una vez en el año de estudio y tienen donaciones anteriores fuera de los dos últimos años. Los donantes habituales son las personas que tienen una o más donaciones en el año de estudio y/o tienen más donaciones dentro de los dos últimos años).

III.1.5.1. Donantes repetidores.

Los donantes repetidores son las personas que han donado sangre una vez y tienen más donaciones en años anteriores o que han donado más veces en el año de estudio. El número de donantes repetidores por año por provincias y en la Comunitat Valenciana se muestra en la tabla 13:

Tabla 13: N° de donantes repetidores en el periodo 1990-2002.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donantes repetidores Castellón y Valencia	26194	30870	36915	41640	44783	46600	47786	50894	53732	58546	60635	61014	63430
N° Donantes repetidores Alicante	10469	12473	14575	16004	16670	18157	18189	19168	19642	19752	20750	22676	23824
N° total donantes repetidores	36663	43343	51490	57644	61453	64757	65975	70062	73374	78298	81385	83690	87254

III.1.5.2. Donantes nuevos.

Los donantes nuevos son personas que han donado sangre por primera vez en el año de estudio y no tienen más de una donación en dicho año. El número de donantes nuevos por año en la Comunitat Valenciana y en sus provincias se muestra en la tabla 14:

Tabla 14: N° de donantes nuevos en el periodo 1990-2002.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donantes nuevos Castellón y Valencia	19268	20926	21604	21115	17144	15295	19961	20725	20755	18173	18311	16522	17425
N° Donantes nuevos Alicante	6884	7649	7484	5594	6946	6638	6779	7203	7283	7404	7971	7275	8528
N° total donantes nuevos	26152	28575	29088	26709	24090	21933	26740	28008	28038	25577	26282	23797	25953

III.1.5.3. Número total de donantes. Porcentaje de donantes nuevos y donantes repetidores por año.

La suma de los donantes nuevos y los donantes repetidores da el número total de donantes de sangre en el periodo 1990-2002. El número de donantes totales por año en la Comunitat Valenciana y sus provincias, se muestra en la tabla 15 y el porcentaje de donantes nuevos y donantes repetidores por año en la Comunitat Valenciana se muestra en la tabla 16.

Tabla 15: N° total de donantes de sangre en el periodo 1990-2002.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donantes total Castellón y Valencia	45462	51796	58519	62755	61927	61895	67747	71619	74487	76719	78946	77536	80855
N° Donantes total Alicante	17353	20122	22059	21598	23616	24795	24968	26371	26925	27156	28721	29951	32352
N° total donantes	62815	71918	80578	84353	85543	86690	92715	97990	101412	103875	107667	107487	113207

Tabla 16: Porcentaje de donantes nuevos y donantes repetidores por año en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1990-2002.

	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
Donantes nuevos (%)	41.6	39.7	36.1	31.7	28.2	25.3	28.8	28.6	27.6	24.6	24.4	22.1	22.9
Donantes repetidores (%)	58.4	60.3	63.9	68.3	71.8	74.7	71.2	71.4	72.4	75.4	75.6	77.9	77.1

III.1.6. Cálculo de la magnitud donante-días para la determinación de la tasa cruda y corregida de incidencia.

El valor del intervalo entre las donaciones de los donantes repetidores en los periodos de tres años considerados (1990-1992; 1993-1995; 1996-1998; 1997-1999) se ha obtenido mediante listados con el programa BDS, cuyos parámetros eran los siguientes:

1º. Periodo de estudio considerado.

2º. Listado de la relación de los intervalos entre donaciones y número de donantes.

Posteriormente mediante la utilización de una hoja de cálculo del programa EXCEL de Microsoft se determinó el número de donante-días o donante-años, que es el denominador para determinar la tasa cruda de incidencia.

El intervalo medio entre donaciones en cada periodo de estudio se calculó dividiendo el parámetro donante-días entre el número de donantes repetidores en el periodo de estudio.

El valor donante-días y el intervalo medio entre donaciones en cada periodo de estudio en Valencia + Castellón y en Alicante se muestran en la tabla 17 y 18.

Con el listado de la relación de los intervalos entre donaciones y el número de donantes que lo componen sin tener en cuenta las donaciones no aptas para la transfusión, se determinó el parámetro donante-días corregido, que es el denominador para el cálculo de la tasa corregida de incidencia. Estos datos se pasaron a programa de cálculo y se obtuvieron los siguientes resultados para Valencia + Castellón (tabla 17) y para Alicante (tabla 18).

Tabla 17: N° de donante-días sin corregir y corregido, n° de donantes repetidores e intervalo medio entre donaciones en Valencia y Castellón.

PERIODO	1990-1992	1993-1995	1996-1998	1997-1999	2000-2002
Donante-días sin corregir	25668045	35561285	39198043	42009160	46333716
Donante-días corregido	25245590	34675730	38480490	40754440	No***
N° donantes repetidores*	47886	62719	70177	74057	80053
Intervalo medio entre donaciones (días)**	536	567	559	567	579

* Número de donantes repetidores obtenido con los listados de la relación de los intervalos entre donaciones y el número de donantes teniendo en cuenta todas las donaciones de los donantes repetidores en el periodo estudiado (donante-años sin corregir).

** Intervalo medio entre donaciones obtenido teniendo en cuenta todas las donaciones de los donantes repetidores en el periodo estudiado (donante-años sin corregir). Este intervalo es el tiempo transcurrido entre la primera y la última donación efectuadas en el periodo.

*** No se pudo hacer el cálculo.

Tabla 18: N° de donante-días sin corregir y corregido, n° de donantes repetidores e intervalo medio entre donaciones en Alicante.

PERIODO	1990-1992	1993-1995	1996-1998	1997-1999	2000-2002
Donante- días sin corregir	11389397	13972076	15026793	15394084	17661507
Donante- días corregido	10757280	13619245	14753665	15157720	No***
N° donantes repetidores*	20582	24476	26924	26559	31629
Intervalo medio entre donaciones (días)**	553	571	558	580	558

* Número de donantes repetidores obtenido con los listados de la relación de los intervalos entre donaciones y el número de donantes teniendo en cuenta todas las donaciones de los donantes repetidores en el periodo estudiado (donante-años sin corregir).

** Intervalo medio entre donaciones obtenido teniendo en cuenta todas las donaciones de los donantes repetidores en el periodo estudiado (donante-años sin corregir).

*** No se pudo hacer el cálculo.

III.1.7. Número de donaciones analizadas por la prueba NAT de cribado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2002 y 1999-2006. Tamaño de los *pools* de unidades de sangre.

Se contabilizaron las unidades analizadas en *pools* por la prueba NAT para la detección de ARN-VHC, desde su puesta en marcha en el Centro de

Transfusión de la Comunitat Valenciana, en el periodo 1999-2002 y en el periodo 1999-2006. Se emplearon los libros de laboratorio de las pruebas NAT. La tabla 19 muestra el número de donaciones analizadas por año por la técnica NAT de cribado en el periodo julio 1999-diciembre 2002 por cada centro y en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. El número de donaciones analizadas por la técnica NAT para la detección del ARN-VHC en la Comunitat Valenciana en los periodos julio 1999-diciembre 2002 y julio 1999-diciembre 2006 se muestran en la tabla 20. El tamaño de las mezclas de plasma o *pools* utilizados para las donaciones de cada provincia de la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2002, se expone en la tabla 21.

Tabla 19: N° de donaciones anuales analizadas por PCR-VHC en el periodo 1999-2002

AÑO	1999 ⁽¹⁾	2000	2001	2.002
N° Donaciones analizadas por PCR-VHC en Valencia y Castellón	55807	115706	114975	120846
N° Donaciones analizadas por PCR-VHC en Alicante	21310	47126	49133	51880
N° de donaciones analizadas por PCR-VHC en la Comunitat Valenciana	77117	162820	164138	172715

(1) Número de donaciones analizadas desde julio de 1999 hasta diciembre de 1999

Tabla 20: N° de donaciones analizadas por PCR-VHC en la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2002 y en el periodo 1999-2006

PERIODOS	1999 ⁽¹⁾ -2002	1999 ⁽¹⁾ -2006
N° de donaciones analizadas por PCR ARN-VHC en la Comunitat Valenciana	574036	1280432

(1) Número de donaciones analizadas desde julio de 1999 hasta diciembre de 1999.

Tabla 21: Tamaño de *pool* de plasma empleado para unidades de sangre de Valencia, Castellón y Alicante en el periodo 1999-2002.

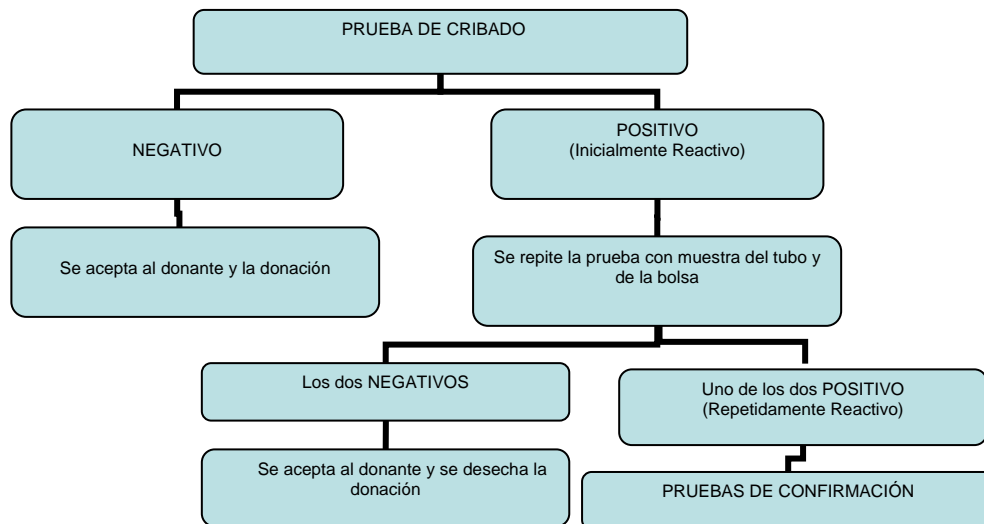
	VALENCIA	CASTELLÓN Y ALICANTE
TAMAÑO <i>POOLS</i> DE UNIDADES DE SANGRE	44	22

III.2. Métodos.

III.2.1. Cuantificación de las donaciones con la prueba de cribado de anticuerpos anti-VHC positiva.

Los criterios de interpretación de los resultados de las pruebas de cribado que se han empleado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, se expusieron en el punto I.2.2.5, y siguen el esquema 2.

Esquema 2: Criterios de interpretación de las pruebas de cribado.



Una unidad de sangre se considera positiva en la prueba de cribado cuando al repetir la prueba por duplicado, una de las repeticiones, al menos, es positiva y se le denomina unidad repetidamente reactiva para un marcador de infección concreto.

En el Centro de Transfusión de Valencia, para obtener el número de donaciones repetidamente reactivas frente a anticuerpos anti-VHC o ARN-VHC positivas en la prueba de cribado y los resultados de las pruebas de confirmación, se utilizó un listado de donantes que tenían alguna donación excluida por algún marcador serológico positivo (VHB, VIH, VHC, Sífilis), obtenido mediante el programa BDS, en el periodo de tiempo de 1992 a 1998. De este listado se extrajeron, para cada periodo de estudio, los donantes con donaciones excluidas de la transfusión sanguínea por ser repetidamente reactivos frente a las pruebas de cribado de detección de los marcadores de la infección por VHC.

De los años 1990 y 1991, los datos de las donaciones repetidamente reactivas y confirmadas para anticuerpos anti-VHC se extrajeron de los libros de laboratorio y de los libros de repeticiones, debido a que el programa informático utilizado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana sufrió una depuración de datos y no constan en dicho programa los resultados analíticos de las unidades de sangre de estos años.

Los datos de las donaciones repetidamente reactivas y confirmadas de los años 1999, 2000, 2001 y 2002 se extrajeron también de los libros de repeticiones.

En el Centro de Transfusión de Alicante los datos de las donaciones repetidamente reactivos para anticuerpos anti-VHC y confirmadas de todo el periodo de estudio se extrajeron de los libros de repeticiones.

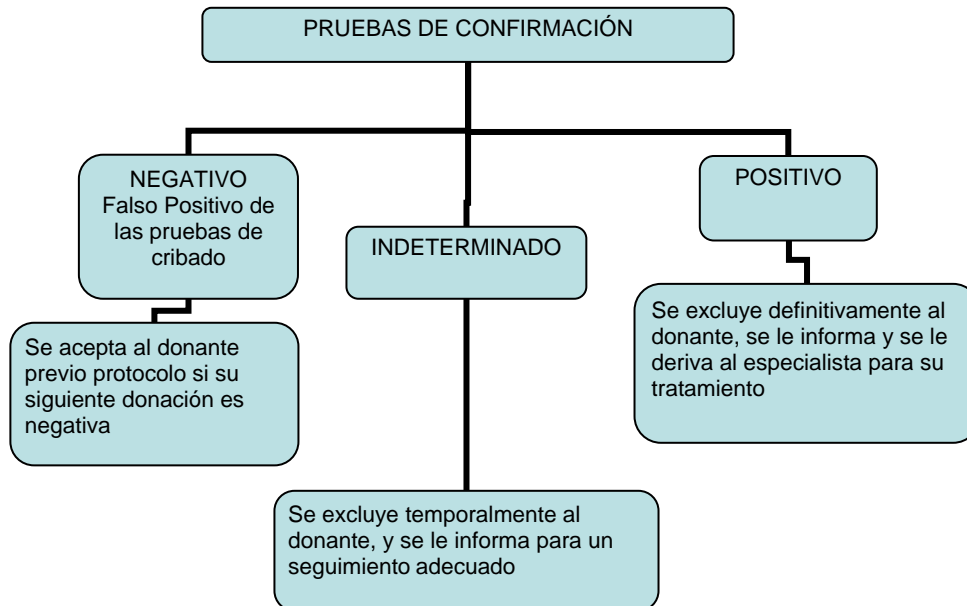
En ambos centros, las donaciones repetidamente reactivas frente a anticuerpos anti-VHC y con la prueba de confirmación (RIBA) de resultado dudoso o sin resultado, fueron comprobadas en el álbum o registro de las pruebas de confirmación VHC y en el registro de las historias clínicas de la infección por VHC.

III.2.2. Cuantificación de los donantes con la prueba serológica VHC de confirmación positiva.

A las unidades de sangre repetidamente reactivas frente a la prueba serológica de cribado, se les realiza la prueba de confirmación serológica. Esta prueba puede tener, en el caso de la detección del VHC, resultado positivo, indeterminado o negativo.

Los criterios de interpretación de los resultados de las pruebas de confirmación y los procedimientos de actuación con respecto al donante de sangre empleados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana se expusieron en el punto I.2.2.5 y siguen el esquema 3.

Esquema 3: Criterios de interpretación de las pruebas de confirmación



Para obtener el número de donantes con las pruebas de detección de marcadores infecciosos frente al VHC, repetidamente reactivos y confirmados, se procedió del mismo modo que en el punto III.2.1, distinguiéndose entre los donantes de primera vez y los donantes repetidores en cada periodo de estudio.

Como donante con marcadores infecciosos frente al VHC confirmados, entendemos a aquél en el que al menos una prueba de confirmación de la infección ha resultado positiva.

1. Donantes repetidores con la prueba serológica VHC de confirmación positiva o número de seroconversiones VHC en los periodos de estudio.

Se tomaron como donantes repetidores aquéllos que tenían más de una donación en cada periodo de estudio, siendo la última donación de dicho periodo positiva para alguna de las pruebas de confirmación utilizadas para detectar la infección por VHC. Un donante se consideró que había seroconvertido para un marcador infeccioso del VHC si había realizado una donación inicial que era negativa para dichos marcadores y posteriormente había realizado una donación

positiva y confirmada para los marcadores infecciosos del VHC dentro de cada intervalo de estudio. Esta donación positiva y confirmada para VHC se comprobó tanto en el registro de las pruebas de confirmación como en los archivos de las historias de los donantes. También se contabilizaron los casos en que los donantes repetidores con marcadores VHC positivos tenían una donación anterior negativa que se había desechado por otro motivo al de la infección por VHC dentro del intervalo de estudio. A los casos se les denominó seroconversiones en el periodo de estudio y se contabilizaron el número de seroconversiones para cada periodo de estudio. Las donaciones anteriores al periodo de estudio de los donantes repetidores no se tuvieron en cuenta.

2. Donantes nuevos con la prueba serológica VHC de confirmación positiva.

Se han considerado como donantes nuevos a las personas que habían donado sangre una sola vez en el periodo de tiempo considerado y dicha donación había sido positiva a alguna de las pruebas de confirmación de infección por VHC. No se tuvo en cuenta si estos donantes tenían alguna donación anterior a cada periodo de estudio (1990-1992, 1993-1995, 1996-1998, 1997-1999 y 2000-2002).

III.2.3. Cálculo de la especificidad de las pruebas de cribado para VHC.

1. Las fechas de utilización de las diferentes versiones de los reactivos de detección de anticuerpos VHC empleados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana son las siguientes:

EIA 1ª generación: Febrero de 1990- Febrero de 1991.

EIA 2ª generación: Marzo de 1991- Junio de 1993.

EIA 3ª generación: Desde Julio de 1993 hasta el momento actual.

RIBA 1ª generación: Julio de 1990- Febrero de 1991 en Valencia y Castellón y Septiembre 1990- Febrero 1991 en Alicante.

RIBA 2ª generación: Marzo de 1991- Junio de 1993.

RIBA 3ª generación: Desde Julio de 1993 hasta el momento actual.

2. Para determinar la especificidad de las pruebas de cribado de 2ª generación, se tomaron los datos del año 1992 de las donaciones repetidamente

reactivas para la prueba de cribado, de las donaciones con la prueba de confirmación positiva y el número de donaciones totales para Valencia y Castellón, para Alicante y para la Comunitat Valenciana.

$$E_{\text{EIA } 2^{\text{a}} \text{ g}} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})$$

siendo:

$$\text{VN}=\text{D}-\text{rr}$$

$$\text{FP}=\text{rr}-\text{RP}$$

$E_{\text{EIA } 2^{\text{a}} \text{ g}}$: Especificidad de la prueba ELISA de 2ª generación.

VN: Verdaderos negativos.

FP: Falsos positivos

D: nº de donaciones totales

rr: nº de unidades repetidamente positivas para la prueba de cribado.

RP: nº de donaciones con la prueba de confirmación RIBA positivo.

3. Para determinar la especificidad de las pruebas de cribado de 3ª generación se tomaron los datos del periodo (1994–2002) de las donaciones repetidamente reactivas para la prueba de cribado, de las donaciones con la prueba de confirmación positiva y el número de donaciones totales para Valencia y Castellón, para Alicante y para la Comunitat Valenciana.

$$E_{\text{EIA } 3^{\text{a}} \text{ g}} = \text{VN}/(\text{VN}+\text{FP})$$

siendo:

$E_{\text{EIA } 3^{\text{a}} \text{ g}}$: Especificidad de la prueba ELISA de 3ª generación.

VN: Verdaderos negativos.

FP: Falsos positivos

D: nº de donaciones totales

rr: nº de unidades repetidamente positivas para la prueba de cribado.

RP: nº de donaciones con la prueba de confirmación RIBA positivo.

III.2.4. Valoración de la utilidad de la determinación de ALT como marcador indirecto de infección por VHC en donantes de sangre.

1. Se determinó la proporción de donantes VHC confirmados que tenían la ALT alterada con respecto a los donantes VHC confirmados totales en el periodo 1992-2002.

2. Se determinó la proporción de donantes con la prueba NAT de confirmación (PCR) positiva que tenían la ALT alterada con respecto a los donantes VHC confirmados totales con la ALT alterada en el periodo 2000-2002. También se determinó esta proporción en el periodo 1996-2002 en Valencia y Castellón debido a que se disponía de datos reflejados en los libros de laboratorio.

3. Se determinó la proporción de donantes con PCR-VHC positivo con la ALT alterada en relación a los donantes VHC confirmados totales con la ALT alterada en el periodo 2000-2002 y en el periodo 1996-2002.

4. Se obtuvo la proporción de donantes de sangre VHC confirmados con la ALT alterada con respecto al número de donaciones totales con la ALT alterada en el periodo 1992-2002.

5. Por último determinó el porcentaje de donaciones con la ALT alterada respecto a las donaciones totales habidas en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1992-2002.

III.2.5. Cálculo de la prevalencia de la infección por VHC en donantes de sangre.

La prevalencia de la infección por VHC en la población de donantes de sangre se calculó por cada año del periodo de estudio (1990-2002) para las provincias de Valencia y Castellón, para la provincia de Alicante y para la totalidad de la Comunitat Valenciana, utilizando la ecuación:

$$P = CA/PA; \text{ donde}$$

P: Prevalencia

CA: nº de donantes nuevos VHC confirmados en el año de estudio.

PA: nº de donantes nuevos en el año de estudio.

La prevalencia vendrá expresada por 10^3 donantes de sangre.

III.2.6. Cálculo de la tasa cruda de incidencia de la infección por VHC en donantes de sangre.

La tasa de incidencia se calculó para los diferentes periodos de estudio (1990-1992); (1993-1995); (1996-1998); (1997-1999); y (2000-2002) para las provincias de Valencia y Castellón, para la provincia de Alicante y para la Comunitat Valenciana.

Para el cálculo de la tasa cruda de incidencia se utilizó la expresión:

$$I = C / T; \text{ donde}$$

I: tasa cruda de incidencia referido a 10^5 donantes.

C: nº de donantes repetidores que durante el periodo de estudio han efectuado al menos una donación seronegativa y que seroconvierten para los marcadores de infección por VHC dentro del periodo de estudio.

T: nº de donante-años en riesgo de infección por VHC en el periodo de estudio considerado.

El nº de donantes repetidores que seroconvierten para marcadores VHC en cada periodo de estudio (C) se ha obtenido mediante la base de datos IMAGE 250/260 del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana que utiliza el programa de Banco de Sangre SYSBANK. Las seroconversiones fueron comprobadas revisando los sistemas manuales de registro (los libros de repeticiones y los álbumes de las pruebas de confirmación VHC) para excluir los resultados falsos positivos o interpretaciones erróneas de las pruebas.

Para hallar el denominador de la tasa de incidencia o número de donantes-año (T), en los periodos de estudio 1990-1992; 1993-1995; 1996-1998 y 1997-1999, se utilizó el método de sumar los intervalos entre la primera y la última donación de todos los donantes repetidores durante el periodo de estudio considerado, empleando el programa informático del centro SYSBANK, el cual genera un listado con el número de donantes a los que corresponde un intervalo dado entre donaciones. Este listado se trasladó a una hoja de cálculo y se obtuvo la suma de los productos del número de donantes por cada intervalo entre donaciones, que es la cantidad total de donante-años en riesgo. El denominador de la tasa de incidencia del periodo 2000-2002 se calculó utilizando un programa informático desarrollado por el Centro de Transfusión de Granada-Almería en el

que se integraron los archivos de la base de datos de las donaciones de sangre realizadas en dicho periodo. De este modo se calculó el número de donantes que habían realizado, al menos, dos donaciones durante el periodo de estudio (donantes repetidores) las donaciones realizadas por éstos y la totalidad de intervalos entre la primera y la última donación de todos los donantes repetidores, para obtener el número de donante-años en riesgo.

III.2.7. Cálculo de la tasa corregida de incidencia de la infección por VHC en donantes de sangre

La tasa corregida de incidencia (Ia) se calculará para los diferentes periodos de estudio expuestos anteriormente menos para el periodo 2000-2002, del cual no se pudo disponer de datos. El cálculo se realizará para las provincias de Valencia y Castellón, para la provincia de Alicante y para la Comunitat Valenciana.

La tasa corregida de incidencia tiene en cuenta la seguridad adicional que proporciona a la distribución de hemoderivados la realización de marcadores indirectos de la infección (ALT elevada), falsos positivos en las pruebas de cribado y la posibilidad de autoexclusión del donante.

Su cálculo vendrá dado por la expresión expuesta en el apartado anterior:

$$I a = C a / T a$$

siendo:

Ia: tasa corregida de incidencia referido a 10^5 donantes.

Ca: nº de seroconversiones cuyas donaciones seronegativas previas a la seroconversión no fueron aptas para la transfusión.

Ta: nº de donante-años en riesgo de infección por VHC corregido en el periodo de estudio considerado.

Para el cálculo de la tasa corregida de incidencia se eliminan del numerador (Ca) los casos incidentes para marcadores infecciosos por VHC cuyas donaciones seronegativas previas a la seroconversión no fueron aptas para la transfusión.

El denominador o donante-años (Ta) se vuelve a calcular considerando sólo a los donantes repetidores que durante el periodo de estudio la primera

donación se consideró apta para la transfusión⁶⁶, mediante el mismo método empleado para la determinación del parámetro donante-años para el cálculo de la tasa cruda de incidencia.

III.2.8. Cálculo del riesgo residual de transmisión del VHC por transfusión sanguínea.

Para la estimación del riesgo residual de transmisión del VHC por hemoderivados se empleó el modelo del Grupo para el Estudio de la Epidemiología de Retrovirus en Donantes (REDS), basado en la incidencia y el periodo ventana, aplicado a las donaciones efectuadas por donantes habituales^{3, 38, 66, 67, 135, 136}.

El cálculo se estimó para cada intervalo de estudio teniendo en cuenta tanto la tasa cruda como la tasa corregida de incidencia para las provincias de Valencia y Castellón, para la provincia de Alicante y para la Comunitat Valenciana. Dicha estimación del riesgo se ha obtenido multiplicando la tasa de incidencia de la infección por VHC por la duración del periodo ventana.

$$\mathbf{RR = I \times WP}$$

donde:

RR: Riesgo residual, referido a un millón de donaciones.

I: Tasa cruda de incidencia o tasa corregida de incidencia, referida a cien mil personas.

WP: Periodo ventana de la infección por VHC, referida como fracción de año.

III.2.9. Estimación de la reducción del riesgo con la introducción de nuevas pruebas de cribado.

La estimación de la reducción del riesgo estará referida al último periodo de estudio (2000-2002), en el cual se introdujeron en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana las pruebas basadas en la biología molecular para la detección del ARN-VHC. Para realizar esta estimación se calculó el rendimiento

de la introducción de la prueba NAT y el rendimiento anual de la introducción de dicho método. Se comparó el rendimiento esperado con el rendimiento real obtenido con la introducción de dichas técnicas en la Comunitat Valenciana en el periodo (1999-2002) y en el periodo (1999-2006). El rendimiento esperado con la introducción de la prueba NAT también se comparó con el rendimiento real obtenido de la introducción de las técnicas NAT para España en el periodo (1999-2006) y con el rendimiento real obtenido en España en el periodo (1996-2003), teniendo en cuenta los datos de la industria fraccionadora del plasma, que introdujo la determinación de la prueba NAT en el año 1996.

1. Cálculo del Rendimiento de la introducción de la prueba NAT:

a. Se estimó el riesgo residual para el periodo (2000-2002) teniendo en cuenta el periodo ventana estipulado para las pruebas serológicas de cribado del VHC (RR_{SERO}).

b. Se estimó el riesgo residual para el periodo (2000-2002) teniendo en cuenta el periodo ventana estipulado para las pruebas NAT de detección del ARN-VHC en *pools* de unidades de sangre (RR_{NAT}).

c. El rendimiento esperado (R) viene dado por la diferencia entre el riesgo residual con pruebas serológicas y el riesgo residual con pruebas NAT:

$$R = RR_{\text{SERO}} - RR_{\text{NAT}}$$

2. Rendimiento real obtenido en la Comunitat Valenciana en los periodos (2000-2002) y (1999-2006).

El rendimiento real (R_{OBS}) se calculó dividiendo el número de unidades de sangre ARN-VHC positivas con anticuerpos VHC negativos (n° unidades en periodo ventana VHC) obtenidos en la Comunitat Valenciana en cada periodo entre el número de unidades de sangre analizadas en dicho periodo:

$R_{\text{OBS}} = n^{\circ}$ unidades en periodo ventana VHC / n° total de unidades de sangre en cada periodo.

3. Rendimiento real obtenido en España en el periodo (1999-2006).

Se contabilizaron las unidades de sangre en periodo ventana para la infección por VHC detectados por la introducción de las pruebas NAT en España en el periodo (1999-2006), y el número de unidades de sangre analizadas mediante técnicas NAT, utilizando el sistema de registro de los distintos Centros de Transfusión del Estado Español. La operación se centralizó en el Banc de

Sang i de Teixits de Catalunya.

4. Rendimiento real obtenido en España en el periodo (1996-2003).

Se contabilizaron las unidades de sangre en periodo ventana para la infección por VHC detectadas por la introducción de la prueba NAT en España, por los Centros de Transfusión y por la Industria de fraccionamiento del plasma y el número de unidades totales analizadas por los mismos en dicho periodo. Las unidades de sangre totales analizadas por la Industria de Fraccionamiento del plasma corresponden al periodo anterior a la puesta en marcha de la detección de ARN-VHC por los Centros de Transfusión (1996-1999) y a las unidades de sangre procedentes de los Centros de Transfusión que no introdujeron la técnica NAT, los cuales realizaban la detección del antígeno del VHC y se han obtenido mediante datos proporcionados por dicha industria en el año 2003.

III.2.10. Seguimiento de donantes implicados en hepatitis C asociada a transfusión.

El Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, en sus tres delegaciones de Valencia, Castellón y Alicante, recibe notificaciones de posibles contagios postransfusionales de hepatitis C a través de los servicios de transfusión de los hospitales provinciales y de los distintos juzgados por reclamación de responsabilidad patrimonial.

La metodología de estudio de estos casos es la siguiente:

1. Se verifican los resultados de los marcadores infecciosos de la donación implicada y se identifica al donante de sangre.

2. Se revisan los resultados de los marcadores serológicos de las donaciones posteriores a la donación implicada, por si ésta estuviera en periodo ventana serológico.

3. Si no hay donaciones posteriores o tiene una donación posterior de menos de seis meses a la donación implicada, se cita al donante de sangre para realizarle los análisis de marcadores infecciosos implicados en el supuesto contagio.

4. Si la donación posterior o el análisis de marcadores infecciosos del donante citado son negativos se concluye el seguimiento de este donante y se

sigue estudiando a los demás donantes implicados, si los hay, en el supuesto contagio postransfusional.

III.2.11. Seguimiento de receptores de unidades seronegativas obtenidas previamente a seroconversiones.

El Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, siguiendo la Orden de 2 de julio de 1999, donde se establecen los criterios de interpretación de las pruebas para la detección de los agentes infecciosos en las donaciones de sangre, empezó a notificar las seroconversiones a los hospitales que habían recibido hemoderivados de donaciones de sangre previas a la seroconversión, con el fin de la retirada de dichos hemoderivados y para el seguimiento de los receptores de los mismos.

La metodología de estudio es la siguiente:

1. Se identifica al donante cuya donación ha sido confirmada como positiva para un marcador infeccioso.
2. Se comprueba si tiene donaciones previas negativas para ese marcador infeccioso y que no se han desechado por algún otro motivo.
3. De la donación previa negativa, se determina a qué centros hospitalarios se han enviado los hemoderivados elaborados con dicha donación de sangre.
4. Se notifica a cada centro receptor de hemoderivados de esta incidencia antes de transcurridos siete días, solicitando información sobre si el hemoderivado se transfundió y sobre los receptores de los mismos. Si no se transfundió el hemoderivado se le insta para su destrucción.
5. Si el estudio de los pacientes receptores de los hemoderivados es negativo para el marcador infeccioso estudiado, se concluye dicho estudio.
6. Si el estudio de los pacientes receptores de hemoderivados es positivo para el marcador infeccioso o no se ha podido concluir por la no localización o defunción del paciente, se procede del mismo modo al estudio de las donaciones anteriores si las hay.

III.2.12. Cálculo de la sensibilidad de la prueba NAT de cribado PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche.

Como parte de la valoración de la técnica NAT para la detección del ARN- VHC en todas las unidades de sangre, se determinó la sensibilidad de la técnica RT-PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche, dentro de un estudio en el que intervinieron el Centro de Transfusión de Galicia, Centro de Transfusión de las Islas Baleares, Centro de Transfusión del País Vasco, el Centro de Transfusión de Cataluña y el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. La determinación de la sensibilidad de la técnica RT-PCR por el procedimiento estándar de procesamiento de muestras se realizó mediante diluciones seriadas de un estándar internacional VHC de la ONS¹⁴⁷ el cual tenía 50000 UI/mL por vial y presentaba el genotipo VHC 1b. Las diluciones de este estándar fueron ajustados con plasma negativo humano a las siguientes concentraciones: 400, 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 UI/mL. Todos los Centros de Transfusión recibieron 21 muestras de cada dilución en alícuotas de 250 µL por muestra, las cuales se congelaron a -80 °C hasta su uso. La sensibilidad se determinó mediante la proporción de positivos con respecto a las concentraciones del estándar. Los límites de detección se calcularon al 50% y 95% de probabilidad mediante el análisis Probit aplicado a la sensibilidad y se compararon con los resultados de los demás centros de transfusión que intervinieron en el estudio⁹⁴.

III.2.13. Determinación de la fiabilidad de la técnica de la prueba NAT de cribado PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche.

Para estudiar la fiabilidad de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche como prueba de cribado para la detección de ARN-VHC en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, se ha determinado el número de *pools* de unidades invalidados por el control interno negativo, el número de *pools* que fueron falsos positivos y el número de series invalidadas por controles positivos que resultaron negativos, entre julio de 1999 y octubre de 2001¹⁴⁸.

III.2.14. Determinación de los tiempos de proceso y los recursos humanos necesarios para la introducción de la prueba NAT de cribado PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

En la implantación de la técnica NAT para la detección del ARN-VHC en las donaciones de sangre, se estudiaron los tiempos de proceso de la misma y se establecieron tanto el personal necesario como los turnos de trabajo para poder realizar dicha técnica sin que supusiera una dilación en la liberación de las bolsas de sangre. Este estudio se realizó tanto en el Centro de Transfusión de Valencia como en el Centro de Transfusión de Alicante.

III.2.15. Seguimiento de los donantes de sangre en periodo ventana serológico detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

Se estudiaron los cuatro casos ARN-VHC positivo con anticuerpos VHC negativos detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2006^{59, 149, 150}. El estudio comprendía distintos aspectos:

1. Análisis de la donación de sangre implicada.
2. Donantes repetidores o donantes nuevos. Donaciones previas en los donantes repetidores.
3. Edad, sexo de los donantes y posible vía de contagio de la infección por VHC.
4. En los casos que se pudo, se citó al donante de sangre hasta determinar la seroconversión y así determinar el periodo ventana en cada donante.
5. Se realizó la determinación de la carga vírica de ARN-VHC en plasma, el genotipo VHC y en dos casos se realizó también la determinación del antígeno VHC.

III.2.16. Métodos estadísticos.

1. Como las infecciones por VHC en donantes habituales son un evento raro, que sigue una distribución de Poisson en vez de una distribución normal, se han calculado los límites del intervalo de confianza al 95% de las tasas de incidencia siguiendo un método simplificado propuesto por Haenszel, Loveland y Sirken¹⁵¹.

2. Para comparar las diferencias entre la especificidad de los métodos de cribado de 2ª y 3ª generación, las diferencias entre las proporciones de resultados indeterminados entre las pruebas de confirmación de 2ª y 3ª generación y las diferencias entre las prevalencias anuales de infección por VHC de las provincias de Valencia + Castellón y la provincia de Alicante y de la diferencia entre la proporción de donantes de sangre hombres y mujeres en el periodo de estudio, se ha utilizado la prueba de comparación de dos proporciones del programa de análisis estadísticos G-Stat, versión 1.2.

3. Análisis Probit según el modelo de validación publicado¹⁵². Con este análisis se determinaron los límites de detección al 95% y al 50% a partir de la curva de la proporción de positivos frente a las concentraciones de las distintas diluciones del estándar. Los límites de detección se calcularon con los intervalos de confianza al 95%. El análisis Probit fue realizado por el Dr. Adolfo Eiras⁹⁴, del Centro de Transfusión de Galicia, con el sistema informático de análisis de datos STADISTICA, versión 6, StatSoft, Inc; Tulsa, OK.

IV. RESULTADOS

IV.1. Número de donaciones con la prueba serológica VHC de cribado positiva.

El número de donaciones con la prueba de cribado frente al VHC repetidamente positiva por año de estudio en cada centro de transfusión se expone en la tabla 22:

Tabla 22: N° de donaciones repetidamente reactivas frente al VHC.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° donaciones repetidamente reactivos Castellón y Valencia	461	716	473	477	368	500	283	321	299	296	220	135	151
N° donaciones repetidamente reactivos Alicante	258	214	98	120	94	151	78	77	43	35	56	57	75
N° total donaciones repetidamente reactivos	719	930	571	597	462	651	361	398	342	331	276	192	226

IV.2. Número de seroconversiones VHC en los periodos de estudio.

El número de seroconversiones para VHC o número de donantes repetidores con la prueba serológica VHC de confirmación positiva, encontradas en cada centro de transfusión en los distintos periodos de estudio se muestra en la tabla 23.

Tabla 23: N° de seroconversiones para VHC en los diferentes periodos de estudio.

Periodo	(1990-1992)	(1993-1995)	(1996-1998)	(1997-1999)	(2000-2002)
Seroconversiones VHC Castellón + Valencia	83 (61)*	15	15	11	5
Seroconversiones VHC Alicante	16	3	0	1	1
Seroconversiones VHC Comunitat Valenciana	99 (77)*	18	15	12	6

(*) Seroconversiones sin contar aquellas con donación anterior desechada

IV.3. Número de donantes nuevos con la prueba serológica VHC de confirmación positiva.

El número de donantes nuevos con prueba de confirmación positiva para anticuerpos anti-VHC en los dos centros de transfusión se muestran en la tabla 24.

Tabla 24: N° de donantes nuevos VHC confirmados en el periodo 1990-2002

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donantes nuevos VHC confirmados Castellón y Valencia	94	189	206	175	124	118	109	104	100	72	56	43	42
N° Donantes nuevos VHC confirmados Alicante	10	39	32	37	26	23	21	19	17	9	28	20	28
N° total donantes VHC confirmados	104	228	238	212	150	141	130	123	117	81	84	63	70

IV.4. Número de donaciones con resultado positivo en la prueba de confirmación serológica y en la prueba NAT.

Se ha determinado cuántas donaciones son RIBA positivas y PCR positivas, para Valencia y Castellón, Alicante y la Comunitat Valenciana, por los mismos métodos utilizados para determinar las donaciones repetidamente reactivas y confirmadas para VHC. En Valencia y Castellón el periodo considerado es 1996-2002, porque las donaciones con las pruebas RIBA y PCR positivas quedaron registradas desde el año 1996. Dichas donaciones se muestran en la tabla 25. El número de donaciones con las pruebas de confirmación positivas en Alicante y en la Comunitat Valenciana, corresponden al periodo 2000-2002 y se muestran en la tabla 26 y 27, respectivamente.

Tabla 25: N° de donaciones RIBA positivo, PCR positivo en Valencia y Castellón.

AÑO	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donaciones RIBA POSITIVO PCR POSITIVO	68	88	73	57	50	45	31
N° Donaciones RIBA POSITIVO PCR NEGATIVO	45	33	33	21	17	12	15

Tabla 26: N° de donaciones RIBA positivo, PCR positivo en Alicante.

AÑO	2000	2001	2002
N° Donaciones RIBA POSITIVO PCR POSITIVO	26	15	23
N° Donaciones RIBA POSITIVO PCR NEGATIVO	3	6	7

Tabla 27: N° de donaciones RIBA positivo, PCR positivo en la Comunitat Valenciana.

AÑO	2000	2001	2002
N° Donaciones RIBA POSITIVO PCR POSITIVO	76	60	54
N° Donaciones RIBA POSITIVO PCR NEGATIVO	20	18	22

IV.5. Especificidad de las pruebas de serológicas de cribado para detección de anticuerpos anti-VHC.

En las tablas 28 y 29 se presentan los datos obtenidos sobre la especificidad de las pruebas serológicas de cribado en donantes de sangre para la detección de anticuerpos anti-VHC en donantes de sangre. La especificidad de la técnica EIA de 3ª generación es superior a la obtenida con EIA de 2ª generación ($p < 0.05$).

Tabla 28: Especificidad de las pruebas de cribado de 2ª generación para la detección de anticuerpos anti-VHC (EIA)

Año 1992	rr	RP	D	VN	FP	E
Valencia y Castellón	473	248	84331	83858	225	0.9973
Alicante	98	44	38149	38051	54	0.9986
Comunitat Valenciana	571	292	122480	121909	279	0.9977

E (Especificidad) calculada según la fórmula:

$$E_{EIA} = \frac{VN}{(VN+FP)}; \text{ donde}$$

$$VN = D - rr$$

$$FP = rr - RP$$

VN: verdaderos negativos

FP: falsos positivos

rr: nº de donaciones repetidamente reactivas para la prueba de cribado.

RP: nº de donaciones con la prueba de confirmación RIBA positivo.

D: nº de donaciones totales.

Tabla 29: Especificidad de las pruebas de cribado de 3ª generación para la detección de anticuerpos anti-VHC (EIA)

Años 1994-2002	rr	RP	D	VN	FP	E
Valencia y Castellón	2573	850	952441	949868	1723	0.9982
Alicante	666	215	399923	399257	451	0.9989
Comunitat Valenciana	3239	1065	1352364	1349125	2174	0.9984

E (Especificidad) calculada según la fórmula:

$$E_{EIA} = \frac{VN}{(VN+FP)}; \text{ donde}$$

$$VN = D - rr$$

$$FP = rr - RP$$

VN: verdaderos negativos

FP: falsos positivos

rr: nº de donaciones repetidamente reactivas para la prueba de cribado.

RP: nº de donaciones con la prueba de confirmación RIBA positivo.

D: nº de donaciones totales.

IV.6. Resultado de las pruebas serológicas de confirmación para anticuerpos anti-VHC en las donaciones de sangre.

Se ha determinado el número de donaciones positivas, indeterminadas y negativas para las pruebas de confirmación en los diferentes años de estudio en Valencia y Castellón, en Alicante y en la Comunitat Valenciana, con los mismos métodos utilizados para determinar las donaciones repetidamente reactivas y

confirmadas para VHC. Las tablas 30, 31 y 32 muestran los resultados de las pruebas de confirmación para VHC en cada centro de transfusión y en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

Tabla 30: N° de donaciones RIBA: negativo, RIBA: indeterminado y RIBA: positivo por año de estudio en Valencia y Castellón.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donaciones RIBA NEGATIVO	97	154	90	125	106	210	84	126	148	141	103	38	69
N° Donaciones RIBA INDETERMINADO	150	138	135	158	123	167	86	74	45	77	50	40	36
N° Donaciones RIBA POSITIVO	105	269	248	194	139	123	113	121	106	78	67	57	46

Tabla 31: N° de donaciones RIBA: negativo, RIBA: indeterminado y RIBA: positivo por año de estudio en Alicante.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donaciones RIBA NEGATIVO	69	121	29	53	37	90	35	35	13	12	19	22	33
N° Donaciones RIBA INDETERMINADO	16	39	25	21	22	34	20	23	11	11	8	14	12
N° Donaciones RIBA POSITIVO	34	54	44	46	35	27	23	19	19	12	29	21	30

Tabla 32: N° de donaciones RIBA: negativo, RIBA: indeterminado y RIBA: positivo por año de estudio en la Comunitat Valenciana.

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donaciones RIBA NEGATIVO	166	275	119	178	143	300	119	161	161	152	122	60	102
N° Donaciones RIBA INDETERMINADO	146	177	160	179	145	201	106	97	56	88	58	54	48
N° Donaciones RIBA POSITIVO	134	323	292	240	174	150	136	140	125	90	96	78	76

IV.7. Número de donaciones con valores de ALT superiores al valor de corte.

El valor de corte de ALT, por encima del cual se desechan las unidades de sangre, ha ido variando en el periodo 1990-2002. Así, entre 1990 y 1999 se estableció en 65 U/L y entre 2000 y 2002 fue de 49 U/L. El número de unidades

de sangre con valores de ALT superiores o iguales al valor de corte, en cada centro de transfusión durante el periodo 1990-2002, se ha obtenido mediante las memorias anuales del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. En la tabla 33 se muestra tanto el número de donaciones de sangre desechadas por ALT alterada por año como la proporción de las mismas con respecto al número total de donaciones.

Tabla 33: N° de donaciones con ALT alterada en el periodo 1990-2002 y proporción de donaciones con ALT alterada con respecto al n° de donaciones totales (%).

AÑO	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° donaciones ALT alterada Castellón y Valencia	891 (1.37)	1877 (2.52)	1866 (2.21)	2253 (2.38)	1973 (2.16)	1529 (1.68)	1591 (1.64)	1866 (1.83)	1800 (1.70)	2869 (2.54)	1694 (1.46)	1958 (1.70)	2200 (1.82)
N° donaciones ALT alterada Alicante	338 (1.15)	522 (1.53)	698 (1.83)	696 (1.84)	737 (1.86)	681 (1.64)	636 (1.57)	801 (1.89)	807 (1.84)	880 (2.01)	1124 (2.39)	1180 (2.40)	832 (1.60)
N° total donantes con ALT alterada	1229 (1.30)	2399 (2.21)	2564 (2.09)	2949 (2.22)	2710 (2.07)	2210 (1.67)	2227 (1.62)	2667 (1.85)	2607 (1.74)	3749 (2.39)	2818 (1.73)	3138 (1.91)	3032 (1.76)

IV.8. Número de donaciones VHC confirmados con los valores de ALT superiores al valor de corte.

El valor de corte de ALT se ha expuesto en el apartado anterior.

Se estudiaron los valores de ALT en las unidades de sangre repetidamente reactivas para la prueba de cribado de anti-VHC y que resultaron positivas en la prueba de confirmación, usando la base de datos del sistema informático y los libros de laboratorio de los respectivos centros. La cuantificación de los casos se realizó para Valencia y Castellón, para Alicante y para la totalidad de la Comunitat Valenciana. Dicha cuantificación comprende el periodo 1992-2002 y está realizada por año. No se han tenido en cuenta los datos de 1990 y 1991 porque durante estos dos años se usó como prueba de confirmación el RIBA-1, que detectaba la reactividad para anticuerpos dirigidos contra dos proteínas de VHC codificadas por la misma región genómica (NS4). Esta limitación hacía que muchos casos que con RIBA-2 y RIBA-3 serían clasificados como positivos, por

RIBA-1 fueran negativos y que algunos casos positivos por RIBA-1 fueran indeterminados por RIBA-2 y RIBA-3. El número de donantes VHC confirmados con ALT alterada en cada centro de transfusión y en la totalidad de la Comunitat Valenciana, se muestra en las tabla 34.

Tabla 34: N° de donantes VHC confirmados con la ALT alterada en el periodo 1992-2002

AÑO	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donantes VHC confirmados con ALT alterada Castellón y Valencia	70	48	38	27	20	21	21	24	14	10	10
N° Donantes VHC confirmados con ALT alterada Alicante	16	11	8	12	8	6	5	5	10	3	6
N° total donantes VHC confirmados con ALT alterada	86	59	46	39	28	27	26	29	24	13	16

IV.9. Número de donaciones con la prueba NAT positiva y la ALT alterada.

El número de donaciones anuales con la prueba NAT positiva y la ALT alterada en Valencia y Castellón en el el periodo 1996-2002. (tabla 35). Las donaciones NAT positivas con la ALT alteradas en Alicante y en la Comunitat Valenciana en el periodo 2000-2002 se muestran en las tablas 36 y 37, respectivamente.

Tabla 35: N° de donaciones PCR positivo y con la ALT alterada en Valencia y Castellón.

AÑO	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
N° Donaciones PCR POSITIVO y ALT alterada	19	19	18	21	14	10	9

Tabla 36: N° de donaciones PCR positivo y con las ALT alteradas en Alicante.

AÑO	2000	2001	2002
N° Donaciones PCR POSITIVO y ALT alterada	10	3	6

Tabla 37: N° de donaciones PCR positivo y con las ALT alteradas en la Comunitat Valenciana.

AÑO	2000	2001	2002
N° Donaciones PCR POSITIVO y ALT alterada	24	13	15

IV.10. Correlación entre la concentración de ALT y los resultados positivos en la prueba de confirmación VHC.

Para valorar la utilidad de la determinación de la concentración de ALT como marcador indirecto de infección por VHC se evaluó si existía correlación entre la positividad en las diferentes pruebas de confirmación de infección por VHC y la presencia de concentraciones alteradas de ALT.

En primer lugar se calculó el porcentaje de donaciones respecto al total de las mismas que presentaban el marcador ALT alterado durante el periodo 1992-2002 (ver tabla 38).

Tabla 38: Proporción de donaciones con ALT alterada con respecto al n° total de donaciones en el periodo 1992-2002.

Periodo (1992-2002)	N° Donaciones totales	N° Donaciones con ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	1040425	21599	2.08%
Alicante	475913	9072	1.91%
Comunitat Valenciana	1516338	30671	2.02%

De éstas, sólo en un porcentaje muy bajo, del orden del 1%, se confirmó la infección por VHC mediante la prueba de confirmación RIBA (ver tabla 39).

Tabla 39: Proporción de donantes VHC confirmados con la ALT alterada con respecto al nº de donantes con al ALT alterada en el periodo 1992-2002.

Periodo (1992-2002)	Nº Donaciones con ALT alterada	Nº Donantes VHC confirmados con ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	21599	303	1.40%
Alicante	9072	90	0.99%
Comunitat Valenciana	30671	393	1.28%

En la tabla 40 se muestra la proporción de los donantes VHC positivos confirmados por la prueba serológica RIBA (RIBA positivos) que presentaban, además, la ALT alterada. Como puede observarse, más de un 65% de los donantes de la Comunitat Valenciana con positividad VHC confirmada por RIBA no presentaban alteración en la concentración de ALT.

Tabla 40: Proporción de donantes VHC confirmados con ALT alterada en relación al nº de donantes VHC confirmados.

Periodo (1992-2002)	Nº Donantes RIBA POSITIVO	Nº Donantes RIBA positivo con ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	1149	303	26.37%
Alicante	260	90	34.62%
Comunitat Valenciana	1409	393	27.89%

Resultados similares fueron obtenidos cuando se calculó el porcentaje de los donantes VHC positivos confirmados por la prueba NAT (RIBA positivos, PCR positivos) que presentaban concentraciones elevadas de ALT.

En la tabla 41 figuran los resultados obtenidos para las tres provincias durante el periodo 2000-2002 y en la tabla 42 se especifican, a parte, los resultados para Valencia + Castellón obtenidos desde 1996, fecha en que se instauró la tecnología PCR en estas provincias (en Alicante no se implantó hasta mediados de 1999).

Tabla 41: Proporción de donantes VHC confirmados con la PCR positiva y con la ALT alterada con respecto al nº de donantes VHC confirmados con la PCR positiva en el periodo 2000-2002.

Periodo (2000-2002)	Nº Donantes RIBA POSITIVO+PCR POSITIVO	Nº Donantes RIBA POSITIVO+PCR POSITIVO+ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	126	33	26.19%
Alicante	64	19	29.69%
Comunitat Valenciana	190	52	27.37%

Tabla 42: Proporción de donantes VHC confirmados con la PCR positiva y con la ALT alterada con respecto al nº de donantes VHC confirmados con la PCR positiva en el periodo 1996-2002.

Periodo (1996-2002)	Nº Donantes RIBA POSITIVO+PCR POSITIVO	Nº Donantes RIBA POSITIVO+PCR POSITIVO+ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	412	110	26.70%

Finalmente pudo observarse que la gran mayoría de los donantes con la ALT alterada en los que se confirmó la infección por VHC por la positividad en el RIBA, fueron también ARN-VHC positivos. En la tabla 43 se muestran los datos obtenidos para el periodo 2000-2002 en toda la Comunitat y en la tabla 44, los referidos sólo a Valencia + Castellón desde 1996 a 2002.

Tabla 43: Proporción de donantes VHC confirmados con PCR positiva y ALT alterada con respecto al nº de donantes VHC confirmados con ALT alterada en el periodo 2000-2002

Periodo (2000-2002)	Nº Donantes VHC confirmados con ALT alterada	Nº Donantes RIBA POSITIVO+PCR POSITIVO+ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	34	33	97%
Alicante	19	19	100%
Comunitat Valenciana	53	52	98%

Tabla 44: Proporción de donantes VHC confirmados con PCR positiva y ALT alterada con respecto al nº de donantes VHC confirmados con ALT alterada en el periodo 1996-2002

Periodo (1996-2002)	Nº Donantes VHC confirmados con ALT alterada	Nº Donantes RIBA POSITIVO+PCR POSITIVO+ALT alterada	Porcentaje
Valencia +Castellón	120	110	91%

IV.11. Número de donaciones en periodo ventana serológico detectadas en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en los periodos 1999-2002 y 1999-2006.

Se contabilizaron los casos de unidades de sangre con ARN-VHC positivo y anticuerpos anti-VHC negativo encontrados en la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2002 y 1999-2006, utilizando los libros de laboratorio de las pruebas NAT. Las tablas 45 y 46 exponen el número de donaciones en periodo ventana contabilizados por cada centro de transfusión en los dos periodos de tiempo:

Tabla 45: Nº de unidades de sangre con anticuerpos VHC negativo y ARN-VHC positivo por año, en el periodo 1999-2002

AÑO	1999 ⁽¹⁾	2000	2001	2.002
Nº de unidades de sangre con anticuerpos anti-VHC negativo/ ARN-VHC positivo en Valencia y Castellón	0	1	1	0
Nº de unidades de sangre con anticuerpos anti-VHC negativo/ ARN-VHC positivo en Alicante	0	0	0	0
Nº de unidades de sangre totales con anticuerpos anti- VHC negativo/ ARN-VHC positivo en la Comunitat Valenciana	0	1	1	0

(1) Periodo desde julio de 1999 hasta diciembre de 1999

Tabla 46: N° de unidades de sangre con anticuerpos VHC negativo y ARN-VHC positivo en el periodo 1999-2002 y en el periodo 1999-2006

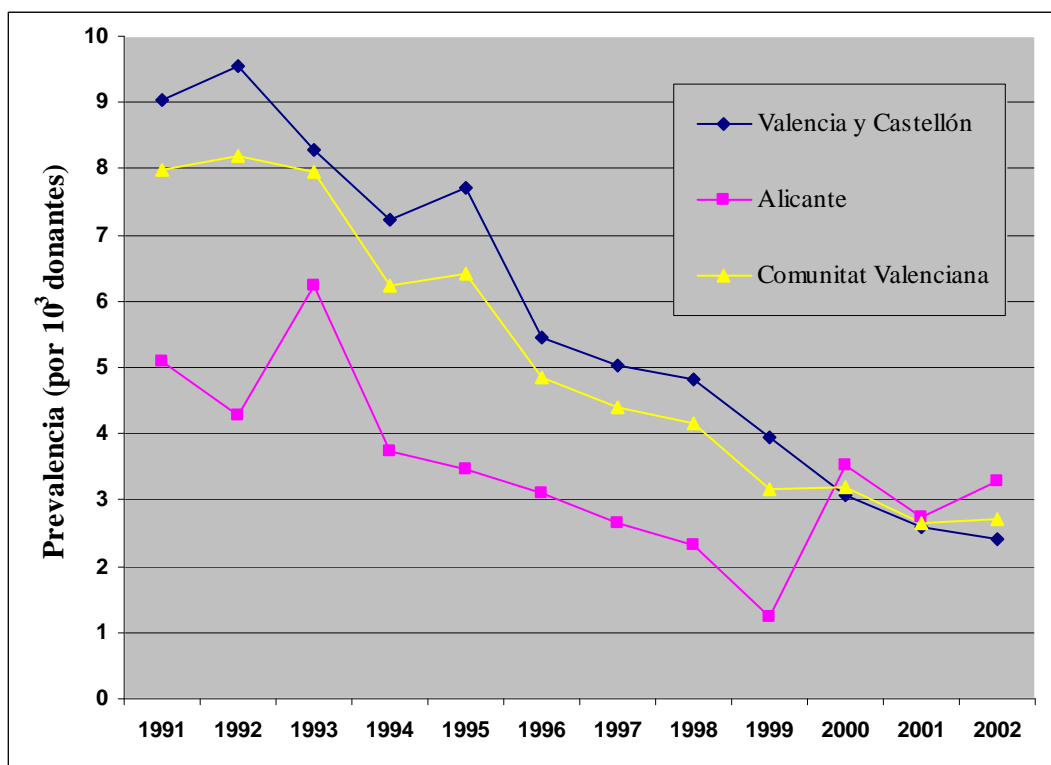
PERIODOS	1999⁽¹⁾-2002	1999⁽¹⁾-2006
N° de unidades de sangre totales con anticuerpos anti- VHC negativo/ ARN-VHC positivo en la Comunitat Valenciana	2	4

(1) Periodo desde julio de 1999 hasta diciembre de 1999

IV.12. Prevalencia anual de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana durante el periodo 1991-2002.

En la gráfica 3 se representa la variación de la prevalencia anual de infección por VHC desde 1991 hasta 2002 en la Comunitat Valenciana y sus provincias.

Gráfica 3: Prevalencia anual de infección por VHC por 10³ donantes en la Comunitat Valenciana y sus provincias.



AÑO	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
PREVALENCIA x 10 ³ donantes												
Valencia y Castellón	9.03	9.54	8.29	7.23	7.72	5.46	5.02	4.82	3.96	3.06	2.60	2.41
Alicante	5.10	4.28	6.24	3.74	3.47	3.10	2.64	2.33	1.22	3.51	2.75	3.28
Comunitat Valenciana	7.98	8.18	7.94	6.23	6.43	4.86	4.39	4.17	3.17	3.20	2.65	2.70

IV.13. Tasas crudas y corregidas de incidencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.

La tasa cruda de incidencia fue calculada a partir del número de donante-años en riesgo de infección por VHC y el número de donantes repetidores que efectuaron al menos una donación seronegativa y que seroconvirtieron para los marcadores de infección por VHC dentro del periodo de tiempo considerado (ver Material y Métodos, apartado III.2.6). Para el cálculo de tasa corregida sólo se tienen en cuenta los donantes repetidores cuya primera donación en el periodo de

estudio se consideró apta para la transfusión (ver Material y Métodos, apartado III.2.7).

En las siguientes tablas se presentan las tasas crudas y corregidas de incidencia de infección por VHC en Valencia + Castellón (tabla 47), Alicante (tabla 48) y Comunitat Valenciana (tabla 49)

Tabla 47: Tasas crudas y corregidas de incidencia por 10⁵ donante-años en Valencia y Castellón, en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Donante- años ⁽¹⁾	Donante- años corregido ⁽¹⁾	Serocon versiones ⁽²⁾	Serocon versiones corregidas ⁽²⁾	Tasa cruda de Incidencia por 10 ⁵ donante -años (95 % CI)	Tasa corregida de Incidencia por 10 ⁵ donante - años (95 % CI)
1990-1992	70323	69166	83	61	118.03 (94.58-147.18)	88.19 (68.04-114.38)
1993-1995	97428	95002	15	15	15.40 (8.62-25.41)	15.79 (8.84-26.05)
1996-1998	107392	105426	15	15	13.97 (7.82-23.05)	14.23 (7.97-23.48)
1997-1999	115093	111656	11	11	9.56 (4.77-17.11)	9.85 (4.92-17.63)
2000-2002	126942	No ³	5	No ³	3.94 (1.28-9.18)	No

(1) Donante-años calculado a partir de la tabla 17, dividiendo el número de donante-días entre 365.

(2) Datos de seroconversiones obtenidos de la tabla 23.

(3) No realizado.

Tabla 48: Tasas crudas y corregidas de incidencia por 10⁵ donante-años en Alicante, en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Donante-años ⁴	Donante-año scorregido ⁴	Serocon versiones ⁵	Serocon versiones corregidas ⁵	Tasa cruda de Incidencia por 10 ⁵ donante - años (95 % CI)	Tasa corregida de Incidencia por 10 ⁵ donante - años (95 % CI)
1990-1992	30613	29472	16	16	52.27 (29.90-84.70)	54.29 (31.05-87.95)
1993-1995	38280	37313	3	3	7.84 (1.62-22.89)	8.04 (1.66-23.48)
1996-1998	41169	40421	0	0	0	0
1997-1999	42176	41528	1	1	2.37 (0.060-13.20)	2.41 (0.061-13.42)
2000-2002	48388	No ⁶	1	No ⁶	2.07 (0.052-11.53)	No

(4) Donante-años calculado a partir de la tabla 18, dividiendo el número de donante-días entre 365.

(5) Datos de seroconversiones obtenidos de la tabla 23.

(6) No realizado.

Tabla 49: Tasas crudas y corregidas de incidencia por 10⁵ donante-años en la Comunitat Valenciana, en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Donante- años ⁷	Donante- años corregido ⁷	Serocon versiones ⁸	Serocon versiones corregidas ⁸	Tasa cruda de Incidencia por 10 ⁵ donante- años (95 % CI)	Tasa corregida de Incidencia por 10 ⁵ donante - años (95 % CI)
1990-1992	100936	98638	99	77	98.08 (80.14-119.85)	78.06 (61.99-98.04)
1993-1995	135708	132315	18	18	13.26 (7.86-20.95)	13.60 (8.07-21.49)
1996-1998	148561	145847	15	15	10.10 (5.66-16.67)	10.29 (5.76-16.98)
1997-1999	157269	153184	12	12	7.63 (3.95-13.35)	7.83 (4.05-13.70)
2000-2002	175330	No ⁹	6	No ⁹	3.42 (1.26-7.46)	No

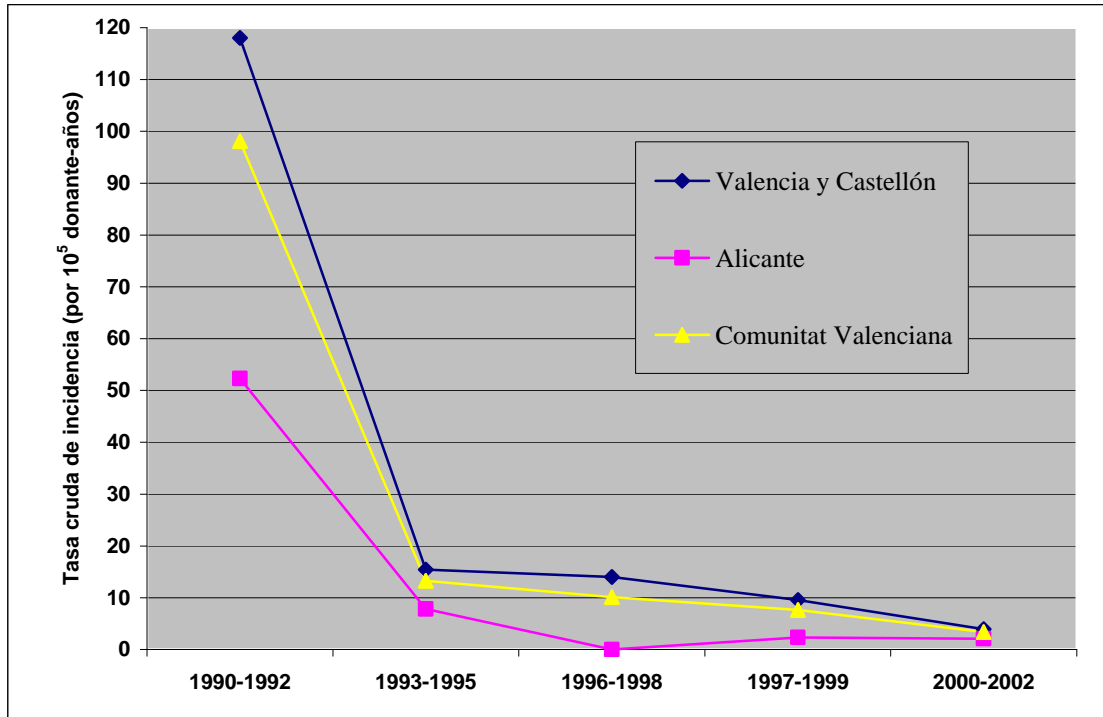
(7) Donante-años calculado a partir de la tabla 17 y 18, dividiendo el número de donante-días entre 365.

(8) Datos de seroconversiones obtenidos de la tabla 23

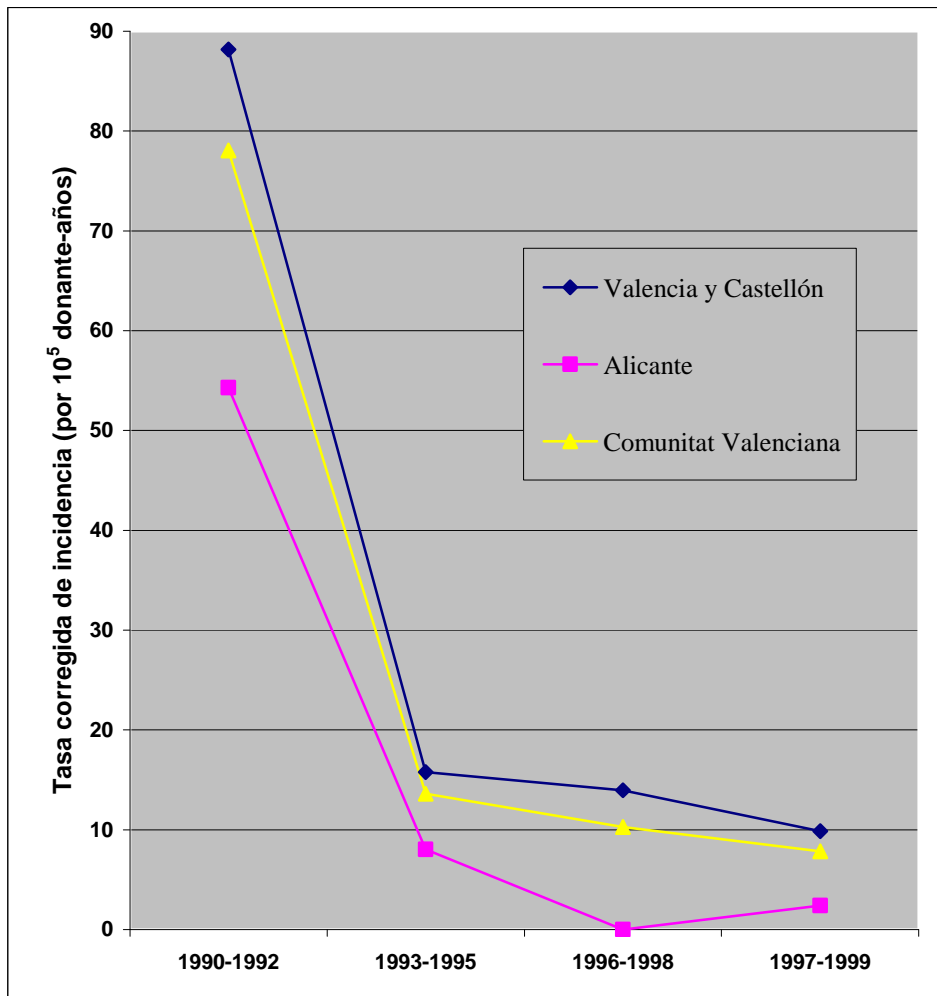
(9) No realizado.

En las gráficas 4 y 5 se representa la variación de las tasas de incidencia cruda (gráfica 4) y corregida (gráfica 5) durante los periodos de estudio.

Gráfica 4: Variación de la tasa cruda de incidencia por 10^5 donante-años en función del tiempo



Gráfica 5: Variación de la tasa corregida de incidencia por 10⁵ donante-años en función del tiempo



IV.14. Estimación del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.

IV.14.1 Estimación del riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia.

En las tablas 50, 51 y 52, se representan los valores del riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia en las provincias de Valencia + Castellón (tabla 50), Alicante (tabla 51) y total de la Comunitat Valenciana (tabla 52):

Tabla 50: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones de sangre teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia en Valencia y Castellón en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Tasa cruda de Incidencia por 10 ⁵ donante-años (95 % CI)	WP* e intervalo (días)	WP e intervalo (1/365)	RR _C ** por 10 ⁶ donaciones
1990-1992	118.03 (94.58-147.18)	82 (54-192)	0.225 (0.148-0.526)	265.57 (139.93-774.21)
1993-1995	15.40 (8062-25.41)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	27.87 (8.97-65.44)
1996-1998	13.97 (7.82-23.05)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	25.29 (8.14-59.36)
1997-1999	9.56 (4.77-17.11)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	17.30 (4.97-44.06)
2000-2002	3.94 (1.28-9.18)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	7.13 (1.33-23.64)
2000-2002	3.94 (1.28-9.18)	12 (7-12)	0.033 (0.019-0.033)	1.30 (0.24-3.02)

* WP: Periodo ventana obtenido por bibliografía.

** RR_C: Riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia.

Tabla 51: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones de sangre teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia en Alicante en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Tasa cruda de Incidencia por 10 ⁵ donante-años (95 % CI)	WP* e intervalo (días)	WP e intervalo (1/365)	RR _C ** por 10 ⁶ donaciones
1990-1992	52.27 (29.90-84.70)	82 (54-192)	0.225 (0.148-0.526)	117.61 (44.24-445.55)
1993-1995	7.84 (1.62-22.89)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	14.19 (1.68-58.95)
1996-1998	0	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	0
1997-1999	2.37 (0.060-13.20)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	4.29 (0.063-34.00)
2000-2002	2.07 (0.052-11.53)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	3.75 (0.052-29.69)
2000-2002	2.07 (0.052-11.53)	12 (7-12)	0.033 (0.019-0.033)	0.68 (0.009-3.79)

* WP: Periodo ventana obtenido por bibliografía.

** RR_C: Riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia.

Tabla 52: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones de sangre teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia en la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio considerados.

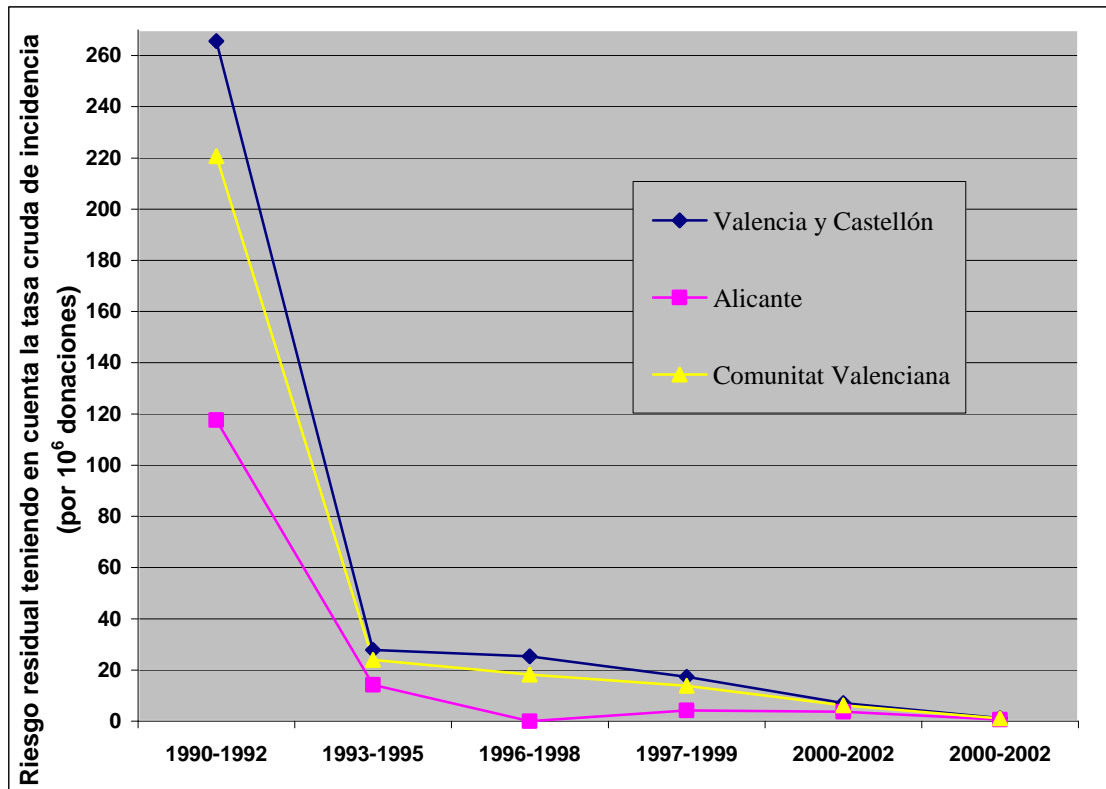
PERIODO	Tasa cruda de Incidencia por 10 ⁵ donantes- año (95 % CI)	WP* e intervalo (días)	WP e intervalo (1/365)	RR _C ** por 10 ⁶ donaciones
1990-1992	98.08 (80.14-119.85)	82 (54-192)	0.225 (0.148-0.526)	220.68 (118.56-630.44)
1993-1995	13.26 (7.86-20.95)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	24.00 (8.18-53.95)
1996-1998	10.10 (5.66-16.67)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	18.28 (5.89-42.93)
1997-1999	7.63 (3.95-13.35)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	13.81 (4.11-34.38)
2000-2002	3.42 (1.26-7.46)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	6.19 (1.31-19.21)
2000-2002	3.42 (1.26-7.46)	12 (7-12)	0.033 (0.019-0.033)	1.12 (0.24-2.45)

* WP: Periodo ventana obtenido por bibliografía.

** RR_C: Riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia.

En la gráfica 6 se representa la variación del riesgo residual crudo de infección por VHC en los diferentes periodos de estudio en Valencia-Castellón, Alicante y la Comunitat Valenciana.

Gráfica 6: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones teniendo en cuenta la tasa cruda de incidencia en los periodos de estudio considerados en la Comunitat Valenciana.



IV.14.2. Estimación del Riesgo Residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia.

En las tablas 53, 54 y 55, se representan los valores del riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia en las provincias de Valencia + Castellón (tabla 53), Alicante (tabla 54) y total de la Comunitat Valenciana (tabla 55):

Tabla 53: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones de sangre teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia en Valencia y Castellón en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Tasa corregida de Incidencia por 10 ⁵ donante-años (95 % CI)	WP* e intervalo (días)	WP e intervalo (1/365)	RR _A ** por 10 ⁶ donaciones
1990-1992	88.19 (68.04-114.38)	82 (54-192)	0.225 (0.148-0.526)	198.13 (100.66-601.67)
1993-1995	15.79 (8.84-26.05)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	28.55 (9.20-67.09)
1996-1998	14.23 (7.97-23.48)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	25.73 (8.30-60.47)
1997-1999	9.85 (4.92-17.63)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	17.81 (5.12-45.40)
2000-2002***	No	No	No	No

* WP: Periodo ventana obtenido por bibliografía.

** RR_A: Riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia.

*** No: No realizado.

Tabla 54: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones de sangre teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia en Alicante en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Tasa corregida de Incidencia por 10 ⁵ donante x años (95 % CI)	WP* e intervalo (días)	WP e intervalo (1/365)	RR _A ** por 10 ⁶ donaciones
1990-1992	54.29 (31.05-87.95)	82 (54-192)	0.225 (0.148-0.526)	121.97 (45.94-462.64)
1993-1995	8.04 (1.66-23.48)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	14.54 (1.73-60.47)
1996-1998	0	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	0
1997-1999	2.41 (0.061-13.42)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	4.36 (0.064-34.56)
2000-2002***	No	No	No	No

* WP: Periodo ventana obtenido por bibliografía.

** RR_A: Riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia.

*** No: No realizado.

Tabla 55: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones de sangre teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia en la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio considerados.

PERIODO	Tasa corregida de Incidencia por 10 ⁵ donante x años (95 % CI)	WP* e intervalo (días)	WP e intervalo (1/365)	RR _A ** por 10 ⁶ donaciones
1990-1992	78.06 (61.99-98.04)	82 (54-192)	0.225 (0.148-0.526)	175.37 (91.71-515.72)
1993-1995	13.60 (8.07-21.49)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	24.59 (8.40-55.34)
1996-1998	10.29 (5.76-16.98)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	18.61 (6.00-43.73)
1997-1999	7.83 (4.05-13.70)	66 (38-94)	0.181 (0.104-0.257)	14.16 (4.22-35.70)
2000-2002***	No	No	No	No

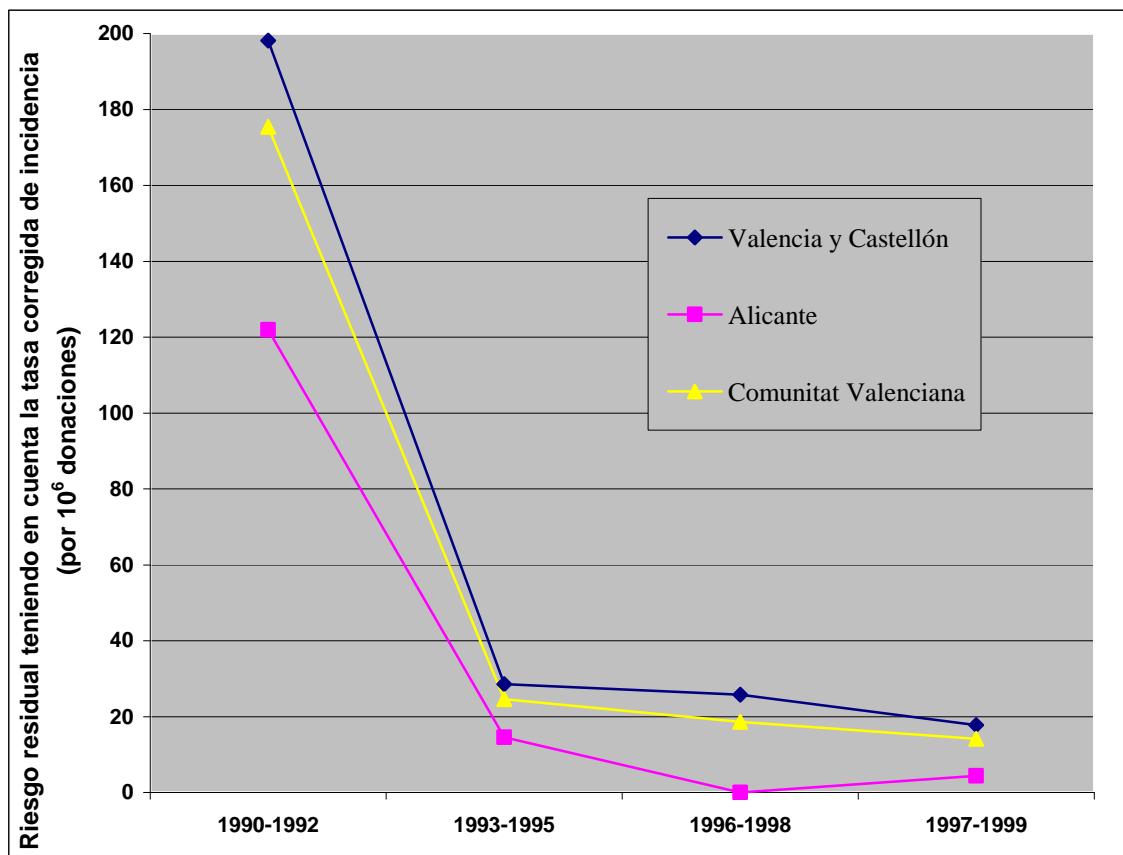
* WP: Periodo ventana obtenido por bibliografía.

** RR_A: Riesgo residual de infección por VHC teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia.

*** No: No realizado.

En la gráfica 7 se representa la variación del riesgo residual corregido de infección por VHC en los diferentes periodos de estudio en Valencia-Castellón, Alicante y la Comunitat Valenciana.

Gráfica 7: Riesgo residual de infección por VHC por 10⁶ donaciones teniendo en cuenta la tasa corregida de incidencia en los periodos de estudio considerados en la Comunitat Valenciana.



IV.15. Estimación de la reducción del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana con la introducción de nuevas pruebas de cribado.

IV.15.1. Reducción del riesgo residual de transmisión de VHC con la introducción de las pruebas NAT en la Comunitat Valenciana: Rendimiento esperado.

La reducción esperada del riesgo residual de transmisión de VHC al introducir la detección de ARN-VHC en el cribado de las donaciones fue estimado como el “rendimiento esperado” y calculado por la diferencia entre el riesgo residual con las pruebas serológicas y el obtenido con la introducción de las pruebas NAT (ver Material y Métodos, apartado III.2.9). En las tablas 56, 57 y 58 se representan los datos obtenidos para Valencia + Castellón, Alicante y Comunitat Valenciana, respectivamente, en el periodo 2000-2002.

Tabla 56: Rendimiento esperado de las técnicas NAT por 10⁶ donaciones en Valencia y Castellón en el periodo 2000-2002.

PERIODO	RR _{SERO} (por 10 ⁶ donaciones)	RR _{NAT} (por 10 ⁶ donaciones)	R (por 10 ⁶ donaciones)
2000-2002	7.13 (1.33-23.64)	1.30 (0.24-3.02)	5.83 (1.09-20.62)

RR_{SERO}: Riesgo residual con las pruebas serológicas.

RR_{NAT}: Riesgo residual con las pruebas NAT.

R: Rendimiento esperado.

Tabla 57: Rendimiento esperado de las técnicas NAT por 10⁶ donaciones en Alicante en el periodo 2000-2002.

PERIODO	RR _{SERO} (por 10 ⁶ donaciones)	RR _{NAT} (por 10 ⁶ donaciones)	R (por 10 ⁶ donaciones)
2000-2002	3.75 (0.052-29.69)	0.68 (0.009-3.79)	3.07 (0.043-25.90)

RR_{SERO}: Riesgo residual con las pruebas serológicas.

RR_{NAT}: Riesgo residual con las pruebas NAT.

R: Rendimiento esperado.

Tabla 58: Rendimiento esperado de las técnicas NAT por 10⁶ donaciones en la Comunitat Valenciana en el periodo 2000-2002.

PERIODO	RR _{SERO} (por 10 ⁶ donaciones)	RR _{NAT} (por 10 ⁶ donaciones)	R (por 10 ⁶ donaciones)
2000-2002	6.19 (1.31-19.21)	1.12 (0.24-2.45)	5.07 (1.07-16.76)

RR_{SERO}: Riesgo residual con las pruebas serológicas.

RR_{NAT}: Riesgo residual con las pruebas NAT.

R: Rendimiento esperado.

IV.15.2 Rendimiento observado con la introducción de las pruebas NAT.

En las siguientes tablas se representa el rendimiento observado con la introducción de las pruebas NAT, calculado a partir del número de donaciones en periodo de ventana serológico para el VHC (ver Material y Métodos, apartado III.2.9), en las provincias de Valencia + Castellón (tabla 59), Alicante (tabla 60) y Comunitat Valenciana (tabla 61).

Tabla 59: Rendimiento NAT observado por 10⁶ donaciones en Valencia y Castellón, en el periodo 1999-2002.

PERIODO	Nº de donaciones analizadas por NAT	Nº donaciones ARN-VHC positivas/ anticuerpos VHC negativos	R _{OBS} (por 10 ⁶ donaciones)
1999-2002	407334	2	4.91

R_{OBS}: Rendimiento NAT observado.

Tabla 60: Rendimiento NAT observado por 10⁶ donaciones en Alicante, en el periodo 1999-2002.

PERIODO	Nº de donaciones analizadas por NAT	Nº donaciones ARN-VHC positivas/ anticuerpos VHC negativos	R _{OBS} (por 10 ⁶ donaciones)
1999-2002	169449	0	0

R_{OBS}: Rendimiento NAT observado.

Tabla 61: Rendimiento NAT observado por 10⁶ donaciones en la Comunitat Valenciana, en el periodo 1999-2002 y en el periodo 1999-2006

PERIODO	Nº de donaciones analizadas por NAT	Nº donaciones ARN-VHC positivas/ anticuerpos VHC negativos	RTO _{OBS} (por 10 ⁶ donaciones)
1999-2002	576790	2	3.47
1999-2006	1280432	4	3.12

R_{OBS}: Rendimiento NAT observado.

Los datos del rendimiento de la introducción de las pruebas NAT obtenidos para España según estudios de la industria fraccionadora de plasma y Centros de Transfusión españoles se representan en la siguiente tabla (tabla 62):

Tabla 62: Rendimiento NAT observado por 10⁶ donaciones en España en el periodo 1996-2003 y en el periodo 1999-2006.

PERIODO	Nº de donaciones analizadas por NAT	Nº donaciones ARN-VHC positivas/ anticuerpos VHC negativos	R _{OBS} (por 10 ⁶ donaciones)
1996-2003 ⁽¹⁾	3957179	16	4.04
1999-2006 ⁽²⁾	6957983	15	2.15

⁽¹⁾ Datos obtenidos a través de la industria de fraccionamiento del plasma.

⁽²⁾ Datos obtenidos a través de los distintos Centros de Transfusión españoles.

R_{OBS}: Rendimiento NAT observado.

IV.16. Hepatitis C asociadas a transfusión en la Comunitat Valenciana en el periodo 1990-2002.

Los casos de infección por VHC detectados en pacientes que han recibido alguna transfusión sanguínea son informados por los centros receptores de hemoderivados a cada Centro de Transfusión, los cuales estudian a los donantes de las unidades transfundidas para comprobar si presentan la infección por VHC. Así, en el periodo 1990-2002 los casos de posibles contagios por VHC que se podrían atribuir a las donaciones de sangre se muestran en las tablas 63, 64 y 65, que corresponden a Valencia + Castellón, Alicante y la Comunitat Valenciana, respectivamente.

Tabla 63: Hepatitis C posiblemente asociadas a transfusión en Valencia y Castellón.

PERIODO	Nº casos informados de Hepatitis C supuestamente postransfusional	Nº de donantes de sangre implicados	Nº de posibles contagios por transfusión
1990-2002	105	987	11

Tabla 64: Hepatitis C posiblemente asociadas a transfusión en Alicante.

PERIODO	Nº casos Hepatitis C supuestamente postransfusional	Nº de donantes de sangre implicados	Nº de posibles contagios por transfusión
1990-2002	45	262	2

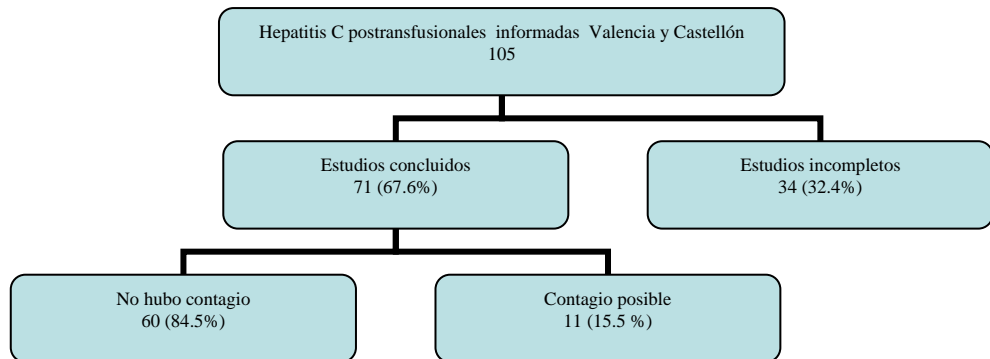
Tabla 65: Hepatitis C posiblemente asociadas a transfusión en la Comunitat Valenciana.

PERIODO	Nº casos Hepatitis C supuestamente postransfusional	Nº de donantes de sangre implicados	Nº de posibles contagios por transfusión
1990-2002	150	1249	13

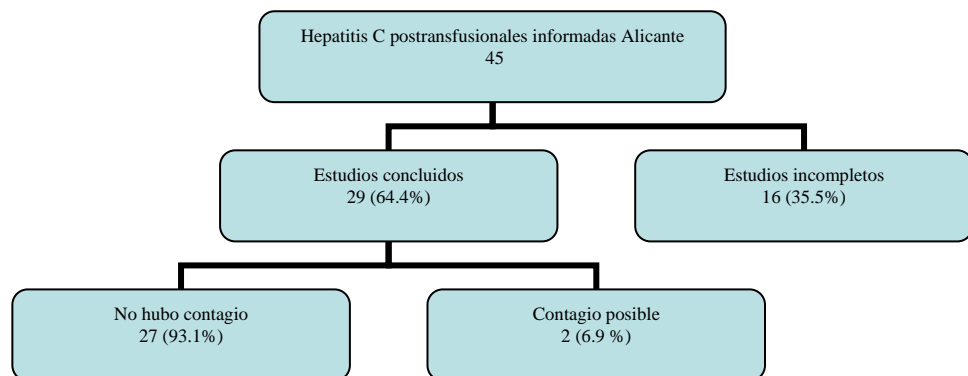
Los estudios realizados por los centros de transfusión de los casos de hepatitis C postransfusional, se consideran concluidos cuando se estudian todos los donantes de sangre implicados en dicho contagio y se comprueba que hay o no hay algún donante portador de la infección por VHC. Si no hay ningún donante implicado con la infección por VHC se concluye que no ha habido contagio por transfusión. Si hay un donante de sangre con la infección por VHC no puede concluirse que fue éste la causa del contagio, porque dicho donante de sangre puede haberse contagiado posteriormente a su donación implicada o el receptor de la donación de sangre podría estar contagiado por VHC anteriormente o haberse contagiado posteriormente a la recepción de la transfusión por otra vía de contagio.

El seguimiento de los casos informados de Hepatitis C postransfusional en Valencia + Castellón, Alicante y la Comunitat Valenciana se muestran en los esquemas 4, 5 y 6.

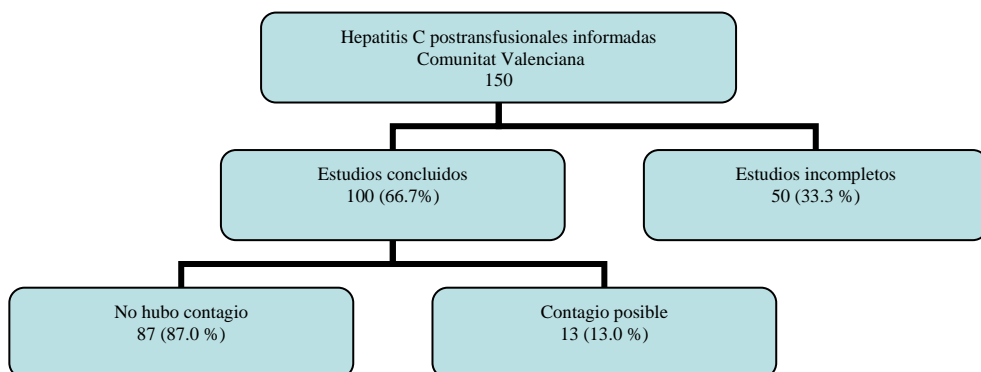
Esquema 4: Estudio de los casos informados de hepatitis C postransfusional en Valencia y Castellón.



Esquema 5: Estudio de los casos informados de hepatitis C postransfusional en Alicante.



Esquema 6: Estudio de los casos informados de hepatitis C postransfusional en la Comunitat Valenciana.



En la siguiente tabla se muestran los datos cronológicos para el seguimiento de los trece casos habidos en Comunitat Valenciana entre 1990 y 2002 (ver esquema 6) de posible contagio de hepatitis C por transfusión (tabla 66):

Tabla 66: Casos de posible contagio de hepatitis C postransfusional en la Comunitat Valenciana notificados en el periodo 1990-2002.

	Fecha de notificación	Fecha donación (1)	Fecha de la 2ª extracción (2)	Tiempo entre donación y 2ª extracción
1	24/05/1990	02/1990	25/06/1990	4 meses
2	02/1990	21/07/1988	03/1990	20 meses
3	17/04/1991	09/09/1990	13/06/1991	9 meses
4	23/05/1991	14/02/1991	13/06/1991	4 meses
5	01/1991	28/12/1990	30/06/1991	7 meses
6	07/10/1993	07/11/1989	08/1990	9 meses
7	05/03/1998	01/02/1988	05/01/1990	23 meses
8	06/04/1999	15/11/1989	18/04/1990	5 meses
9	14/06/2000	10/02/1990	17/11/1991	21 meses
10	14/09/2000	18/03/1988	14/09/2000	12 años y 7 meses
11	24/11/2000	28/09/1990	24/11/2000	10 años y 3 meses
12	24/05/1990	06/1989	01/1991	19 meses
13	17/12/2002	16/10/1990	20/06/1991	8 meses

(1) Donación no analizada mediante la prueba de cribado de detección de anticuerpos anti-VHC o con la prueba de cribado de 1ª generación negativa.

(2) La segunda extracción es la realizada tras la notificación de posible transmisión de VHC postransfusional, que presenta un resultado positivo en la prueba de confirmación serológica.

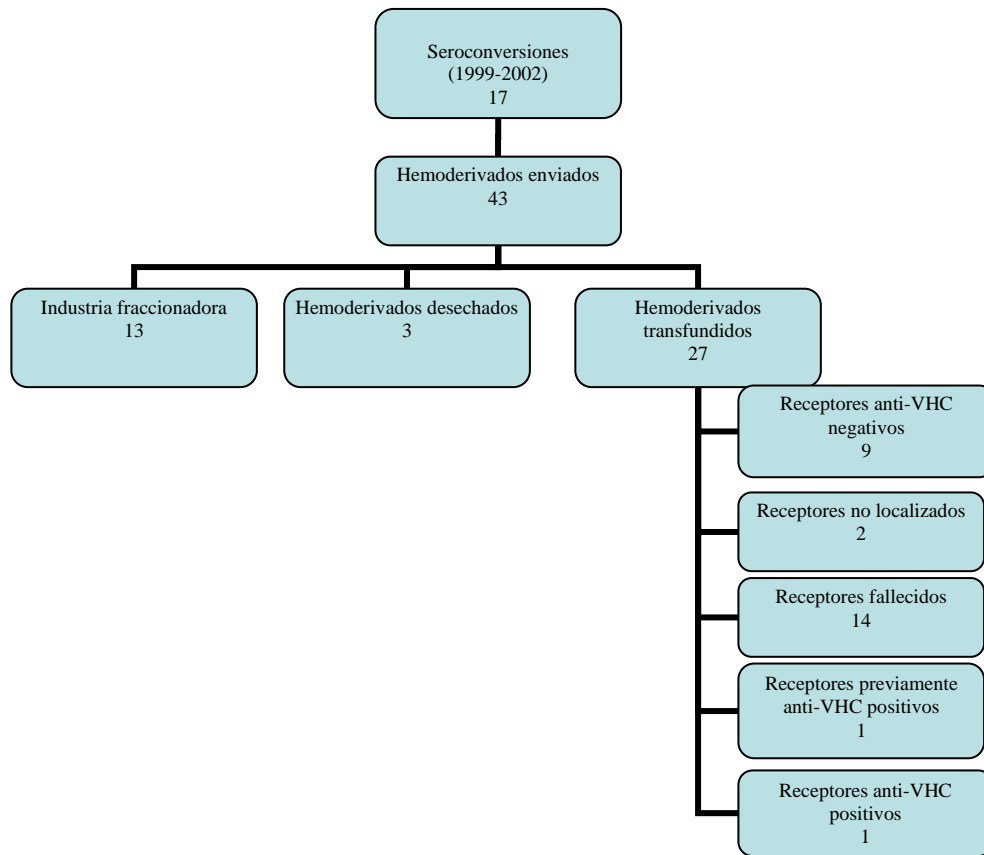
IV.17. Seguimiento de las seroconversiones detectadas por los Centros de Transfusión de la Comunitat Valenciana durante el periodo 1999-2002.

Durante el periodo 1999-2002, los centros de transfusión de la Comunitat Valenciana notificaron un total de 17 seroconversiones a diferentes instituciones y hospitales que habían recibido hemoderivados procedentes de donaciones efectuadas por estos donantes antes de la seroconversión. El estudio retrospectivo

de esas 17 seroconversiones (16 notificadas por Valencia + Castellón y una por Alicante) permitió identificar 43 hemoderivados que habían sido elaborados a partir de esas donaciones. De éstas, 38 hemoderivados procedían del CTCV (Valencia + Castellón) y 5 del Centro de Transfusión de Alicante (CTA), habiendo sido enviados 13 a la industria fraccionadora, 3 desechadas y 27 transfundidos (ver esquema 7). De éstos últimos, solo pudo constatarse un caso (en el CTCV) de posible contagio de hepatitis C, pues el receptor del hemoderivado, anticuerpos anti-VHC seronegativo antes de la transfusión, positivizó frente a anticuerpos anti-VHC tras la transfusión de dicha unidad.

El estudio retrospectivo del donante de sangre implicado en este posible contagio por VHC fue el siguiente: En el año 2002, la donación de sangre fue VHC positiva confirmada por RIBA y por PCR. Se comprobó que tenía donaciones previas a dicha donación. La donación previa en enero de 1992 se desechó por tener la prueba serológica de cribado positiva con un resultado indeterminado en la prueba de confirmación. Se prosiguió el estudio con la donación anterior de 1991 y se comprobó que los hematíes se transfundieron a un receptor que en una analítica de 1996 resultó estar infectado por VHC. Por último se estudió la donación anterior del mismo donante en julio de 1990 comprobándose que el receptor del concentrado de hematíes falleció de una enfermedad que no fue la hepatitis C.

Esquema 7: Seguimiento de seroconversiones (1999-2002) en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.



IV.18. Implantación de las pruebas NAT de cribado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

IV.18.1 Sensibilidad de la prueba NAT de cribado.

1. Los resultados sensibilidad de la prueba PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche, obtenidos en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana se muestran en la tabla 67.

Tabla 67: Sensibilidad de la prueba PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche obtenida en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

ARN-VHC (UI/mL)	Nº de positivos/Nº de muestras analizadas	Positivos (%)
400	21/21	100
200	21/21	100
100	21/21	100
50	21/21	100
25	20/21	95.24
12.5	13/21	61.91
6.25	10/21	47.62

El análisis probit para determinar el límite de detección de la técnica PCR Ampliscreen HCV 2.0 de Roche con un I.C del 95 % para una probabilidad del 50 % y el 95 % en la Comunitat Valenciana se muestra en la tabla 68.

Tabla 68: Límite de detección de la técnica PCR (I.C 95%) para una probabilidad del 50% y 95%, obtenido en la Comunitat Valenciana.

Límite de detección VHC	ARN-VHC (UI/ mL) IC 95 %
95 %	23 (18-50)
50%	7.3 (5.2-9.2)

2. Los resultados obtenidos en el estudio multicéntrico de sensibilidad en el que participó el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana se muestra en la tabla 69.

Tabla 69: Sensibilidad de la prueba PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche obtenida en el estudio multicéntrico en España.

ARN-VHC (UI/mL)	Nº de positivos/Nº de muestras analizadas	Positivos (%)
400	102/103	97.09
200	101/101	100
100	101/103	98.06
50	92/98	93.88
25	78/103	75.73
12.5	49/102	48.04
6.25	29/102	28.43

El análisis probit para determinar el límite de detección de la técnica PCR Ampliscreen HCV 2.0 de Roche (I.C 95%) con una probabilidad del 50 % y el 95 % con los datos de todos los centros se muestra en la tabla 70.

Tabla 70: Límite de detección de la técnica PCR (I.C 95%) para una probabilidad del 50% y 95%, obtenido en el estudio multicéntrico en España.

Límite de detección VHC	ARN-VHC (UI/ mL) I.C 95 %
95 %	69 (56-94)
50%	12 (10-14)

IV.18.2. Determinación de la fiabilidad de la prueba NAT de cribado.

La fiabilidad de la prueba NAT fue evaluada determinando el número de casos invalidados por fallos inherentes a la técnica (ver tabla 71): *pools* o mezclas de unidades invalidados por controles internos negativos, *pools* falsos

positivos y series invalidadas por controles positivos que resultaron negativos (falsos negativos).

Tabla 71: Proporción de *pools* invalidados, *pools* inicialmente reactivos y listas de trabajo invalidadas en el cribado de las unidades de sangre por PCR, en el periodo julio 1999-diciembre 2001.

Nº unidades analizadas	Nº <i>pools</i>	Nº <i>pools</i> invalidados (%)	Nº <i>pools</i> inicialmente reactivos (%)	Nº listas de trabajo	Nº listas de trabajo invalidadas (%)
404075	13796	354 (2.57)	63 (0.46)	1707	91 (5.33)

IV.18.3. Determinación de los tiempos de proceso y los recursos humanos necesarios para la introducción de la prueba NAT de cribado.

El personal entrenado para la realización de la técnica PCR en el cribado de las donaciones de sangre y su adaptación a distintos turnos de trabajo en cada Centro de Transfusión se muestra en la tabla 72. En esta tabla se expone que el Centro de Transfusión de Alicante empleó más personal para la realización de la técnica que el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana y utilizó tres turnos de trabajo. En cambio, el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana utilizó dos turnos de trabajo. En general, el personal del turno de noche (22h-8h) se encargaba de la realización de las pruebas serológicas de cribado previa a la realización de la PCR, la confección y la centrifugación de los *pools* de unidades de sangre y el personal del turno de mañana (8h-15h) realizaba la técnica de la PCR.

Tabla 72: N° de personas entrenadas en la técnica PCR y los turnos de trabajo empleados para realizar la técnica PCR en el Centro de Transfusión de Valencia y en el Centro de Transfusión de Alicante

	N° personas entrenadas PCR	Turnos ⁽¹⁾	N° unidades/día promedio	N° <i>pools</i> /día promedio
CTCV	4	22h-8h y 8h-15h	397	13
CTA	6	22h-8h, 8h-15h y 15h-22h	133	6

(1) Turno 22 h-8 h: Serología previa a la realización de PCR y confección-centrifugación de *pools*.

Turno 8 h- 15 h: Realización de la técnica PCR.

Turno 15 h-22 h: Realización de la técnica PCR (repeticiones, muestras individuales)

Los tiempos promedio de proceso que emplea la técnica PCR desde la confección de los *pools* de unidades de sangre hasta la salida de los resultados, se muestra en la tabla 73:

Tabla 73: Tiempos empleados en la realización de la técnica PCR.

Tiempo promedio de confección de <i>pools</i>	Tiempo de centrifugación de <i>pools</i>	Tiempo promedio de extracción de ARN-VHC	Tiempo promedio de amplificación y detección en Cobas Amplicor	Tiempo total técnica PCR
3 horas	1 hora	1 h 30 m- 2 h	3 h 30 m-4 horas	9 h-10 h

IV.19. Seguimiento de los donantes de sangre en periodo ventana serológico detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

En el periodo junio de 1999-diciembre 2006 se han detectado cuatro donaciones de sangre en periodo ventana serológico para el VHC en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana: dos en el Centro de Transfusión de Valencia y otros dos en el Centro de Transfusión de Alicante.

A continuación se describen los datos más relevantes de estos cuatro donantes:

DONANTE 1.

- Fecha donación en periodo ventana (ARN-VHC positivo, anticuerpos anti-VHC negativo): 13/12/2000
- Lugar/tamaño pool: Centro de Transfusión de Valencia / Pool de 44 unidades de sangre.
- Sexo: Varón
- Edad: 21 años.
- Vía de contagio: No conocida, aunque informó de promiscuidad sexual meses previos a la seroconversión.
- Tipo de donante: Habitual con cinco donaciones previas aptas para la transfusión.
- Fecha de última donación apta para la transfusión: 6/9/2000
- Hemoderivados enviados de su última donación negativa (6/9/2000): Plasma enviado a la industria de fraccionamiento y concentrado de hematíes enviado a hospital. No hay notificación de contagio en los receptores.
- Estudios realizados a la donación y las extracciones posteriores (ver tabla 74):

Tabla 74: Estudios realizados a la donación en periodo ventana serológico y a las extracciones posteriores hasta la seroconversión del donante 1.

Fecha	13.12.00	09.01.01	23.02.01	20.04.01
Anti-VHC	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
RIBA-3	Negativo	Negativo	Indeterminado (C100, +4)	Positivo
ALT (U/L)	12	37	415	160
Ag-VHC	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
Ag-VHC (pg/mL)	Positivo (1.5)	Positivo (88.5)	Negativo (0.7)	Positivo (3.5)
ARN-VHC (UI/mL)	Positivo ($10^{4.8}$)	Positivo ($10^{6.2}$)	Positivo ($10^{4.3}$)	Positivo ($10^{5.1}$)
Genotipo VHC	3a			

DONANTE 2.

- Fecha donación en periodo ventana: 19/11/01
- Lugar/tamaño de pool: Centro de Transfusión de Valencia / *Pool* de 44 unidades.
- Sexo: Varón
- Edad: 44 años.
- Vía de contagio: No conocido.
- Tipo de donante: Nuevo.
- Estudios realizados a la donación (ver tabla 75):

Tabla 75: Estudios realizados a la donación en periodo ventana serológico del donante 2.

Fecha	19/11/2001
Anti-VHC	Negativo
RIBA-3	Negativo
ALT (U/L)	70
Ag-VHC (pg/mL)	Positivo (2141)
ARN-VHC (UI/mL)	Positivo ($10^{6.9}$)
Genotipo VHC	1a

DONANTE 3.

- Fecha donación en periodo ventana: 09/12/2004
- Lugar/tamaño de pool: Centro de Transfusión de Alicante / *Pool* de 44 unidades.
- Sexo: Mujer
- Edad: 39 años.
- Vía de contagio: No conocido.
- Tipo de donante: Habitual con tres donaciones previas negativas.
- Fecha de última donación apta para la transfusión: 22/09/2004
- Hemoderivados enviados de su última donación negativa (22/09/2004): No hay notificación de contagio en los receptores.
- Estudios realizados a la donación y las extracciones posteriores (ver tabla 76).

Tabla 76: Estudios realizados a la donación en periodo ventana serológico y a las extracciones posteriores hasta la seroconversión del donante 3.

Fecha	09.12.04	21.12.04	29.12.04	12.01.05	01.03.05
Anti-VHC	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
RIBA-3	Negativo	Negativo	No testado	No testado	No testado
ALT (U/L)	62	665	1057	222	34
ARN-VHC (UI/mL)	Positivo (10 ^{6.0})	Positivo (10 ^{6.5})	Positivo	Positivo	Negativo
Genotipo VHC	1a				

DONANTE 4.

- Fecha donación en periodo ventana: 28/10/2005
- Lugar/tamaño de pool: Centro de Transfusión de Alicante / *Pool* de 44 unidades.
- Sexo: Varón
- Edad: 32 años.
- Vía de contagio: No conocida.
- Tipo de donante: Habitual con seis donaciones previas negativas.
- Fecha de última donación apta para la transfusión: 09/07/2003
- Hemoderivados enviados de su última donación negativa (09/07/2003): No hay notificación de contagio en los receptores.
- Estudios realizados a la donación y las extracciones posteriores (ver tabla 77).

Tabla 77: Estudios realizados a la donación en periodo ventana serológico y a las extracciones posteriores hasta la seroconversión del donante 4.

Fecha	28/10/2005	09/11/2005
Anti-VHC	Negativo	Positivo
RIBA-3	Negativo	Indeterminado (C33c +1)
ALT (U/L)	526	791
ARN-VHC (UI/mL)	Positivo (10 ^{5.1})	Positivo (10 ^{5.5})
Genotipo VHC	1a	

Los cuatro casos ARN-VHC positivo/anticuerpos anti-VHC negativo se

resumen en la tabla 78:

Tabla 78: Casos ARN-VHC positivo con anticuerpos anti-VHC negativos en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2006.

Donante	Sexo	Edad	Tipo de donante	ARN-VHC/mL	Genotipo VHC	ALT mU/mL	Seroconversión	Vía de contagio
1	Varón	21	Habitual	$10^{4.8}$	3a	12	≤5 meses	¿?
2	Varón	44	Nuevo	$10^{6.9}$	1a	70	no	¿?
3	Mujer	39	Habitual	$10^{6.0}$	1a	62	≤1 mes	¿?
4	Varón	32	Habitual	$10^{5.1}$	1 a	526	≤1 mes	¿?

V.DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

V.1. Características de la población de donantes.

Entre 1990 y 2002 el número de donaciones y de donantes en la Comunitat Valenciana ha ido aumentando año tras año, de forma que en 2002 tanto el número de donantes (tabla 15) como el de donaciones (tabla 12) eran 1.8 veces superiores a los números de donantes y de donaciones en el año 1990. En el periodo 1990-2002, la proporción de donantes de sangre varones ha sido mayor que la proporción de mujeres, siendo estadísticamente significativo ($p < 0.05$). Por otra parte ha habido un descenso progresivo de la proporción de hombres (de 60.4% en 1990 a 55.9% en 2002), con el aumento consiguiente (de 39.6% a 44.12% de la proporción de mujeres donantes (tabla 10). Esto se debe si no completamente al menos en parte, al descenso paralelo de las colectas extraordinarias en establecimientos militares, en las que la mayoría de los donantes (la totalidad en los primeros años) eran hombres.

Hasta el año 2000, el grupo de edad con mayor proporción de donantes era el de 18 a 22 años. En el año 2001 esta condición pasó al grupo de 23 a 27 años y en el año 2002 al de 33 a 37 años (tabla 11). El descenso considerable en la proporción de donantes con edades comprendidas entre 18 y 22 años se debe en parte también a la reducción de colectas efectuadas en establecimientos militares a grupos de donantes cuyas edades se encuentran alrededor de los 20 años.

El porcentaje de donantes repetidores ha aumentado desde 58.4% en 1990 a 77.1% en 2002 (tabla 16), aproximándose al 80% de los países de nuestro entorno⁷⁰. Este aumento es una consecuencia del esfuerzo realizado por el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en la promoción de la donación, que ha permitido reducir la proporción de donaciones obtenidas en colectas extraordinarias, en las que la mayoría de los donantes son nuevos, y aumentar la proporción de donaciones obtenidas en colectas programadas en las que la mayoría de los donantes son habituales.

V.2. Discusión de los métodos.

V.2.1. Recogida de datos relativos a donantes y donaciones.

Debido a la limitada capacidad de almacenamiento del programa BDS, una parte de la información sobre donaciones de sangre anteriores al año 1992 ha quedado registrada únicamente en listados obtenidos al efecto y en los libros de laboratorio.

En distintas pruebas (número de casos RIBA indeterminados, número de casos PCR positivos y número de casos con la ALT alterada) se ha contabilizado el número de donaciones de sangre y no el número de donantes, pudiéndose haber contabilizado distintas donaciones de un mismo donante en un determinado año de estudio. Esto implica que el número de casos contabilizados con el número de donaciones puede ser superior al real, aunque no es un aumento apreciable, debido a que los donantes repetidores, donan una media de 3.79 donaciones en tres años.

V.2.2. Limitaciones del modelo utilizado para el cálculo del riesgo residual.

El modelo del Grupo para el Estudio de la Epidemiología de Retrovirus en Donantes (REDS) para el cálculo del riesgo residual, basado en la incidencia y la duración del periodo ventana, tiene las siguientes limitaciones:

1. No tiene en cuenta el riesgo de las donaciones procedentes de donantes nuevos⁷⁰, que en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana representan una media del 29.35% (22.1%-41.6%) de las donaciones totales, en el periodo 1990-2002, aunque con una clara tendencia a que la proporción de donantes nuevos quede próxima al 20%, un valor similar al de los países de nuestro entorno. Los donantes de sangre nuevos con marcadores positivos para la prueba de cribado de anticuerpos anti-VHC y confirmados posteriormente, son considerados como casos prevalentes de la infección por VHC, pero no son considerados para la estimación del riesgo residual, debido a que estos casos son detectados por las pruebas de cribado y sus donaciones son desechadas. Diversos

trabajos^{9, 72}, en los que se han analizado los rendimientos de las pruebas NAT, indican que las donaciones de sangre de los donantes nuevos presentan una tasa de incidencia de infección por VHC 2.4 veces superior a la tasa de incidencia que presentan los donantes repetidores. Aunque es posible determinar la tasa de incidencia de infección por VHC en todos los donantes de sangre si conocemos la proporción de donantes nuevos y donantes repetidores, en el presente trabajo, como en la mayoría de los publicados sobre esta cuestión⁷², se ha calculado el riesgo residual utilizando este modelo⁷⁰, los autores concluyen que si los donantes nuevos representan el 20% del total no es necesario ajustar los cálculos para tener en cuenta el riesgo debido a este tipo de donantes. Debido a la proporción de donantes nuevos en la Comunitat Valenciana, el no tenerlos en cuenta para el cálculo puede suponer una subestimación del riesgo.

2. Los valores de la duración de los periodos ventana. El periodo ventana de las donaciones de sangre representa el 90% del riesgo de infección por transfusión, siendo del 10% el riesgo de infección debido a variantes víricas, portadores crónicos seronegativos y errores de laboratorio^{40, 70, 138, 153, 154}. Por este motivo resulta muy importante la estimación de los periodos ventana utilizada para los cálculos y que debe ser seleccionada de referencias bibliográficas contrastadas. En el presente trabajo se han tomado estos valores de varios trabajos^{62, 70-72}, que establecen duraciones de 82 días para las pruebas de cribado de anticuerpos anti-VHC de 2ª generación, 66 días para las pruebas de cribado de anticuerpos anti-VHC de 3ª generación y entre 7 y 12 días para las pruebas basadas en la tecnología de ácidos nucleicos (NAT). En el trabajo de revisión de Glynn S.A, et al⁷², se considera que el periodo ventana en las pruebas NAT utilizadas en España y en la Comunitat Valenciana entre 1997 y 1999 es de 7 días, con un límite superior de 12 días. Hemos considerado este último valor más elevado, de 12 días, para intentar contrarrestar el efecto de subestimación del riesgo por no tener en cuenta el que es debido a los donantes nuevos.

3. El modelo utilizado en general y este trabajo en particular no tienen en cuenta la contribución al riesgo de donantes repetidores con infección crónica por VHC sin marcadores serológicos detectables. Aunque según datos de 1992, hasta un 10% de personas con hepatitis C adquirida en la población podrían no ser identificadas con las pruebas de cribado para donantes⁷⁰, creemos que esta proporción es cada vez más baja y, con las pruebas de cribado de anticuerpos

anti-VHC de 3ª generación y especialmente con las pruebas NAT, actualmente es prácticamente nula.

4. Otra de las limitaciones del modelo, el que los cálculos estén realizados con datos de una fracción pequeña del total de donantes de la población considerada, no es aplicable a este trabajo, ya que en él los cálculos están realizados con datos del total de población de la Comunitat Valenciana.

V.3. Discusión de los resultados.

V.3.1. Especificidad de las pruebas serológicas de cribado.

La especificidad de las pruebas serológicas de cribado se ha determinado dividiendo el número de verdaderos negativos por la suma de los verdaderos negativos y los falsos positivos.

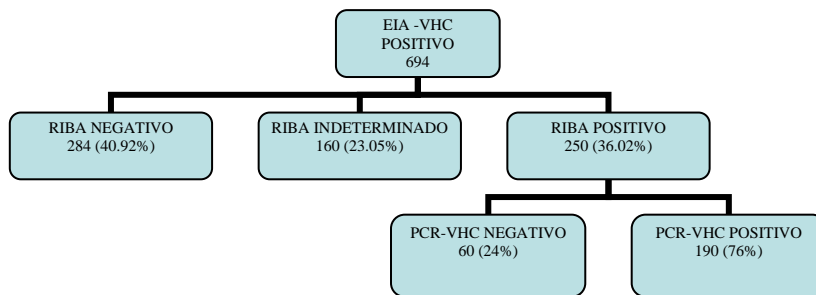
El estudio de la especificidad de las pruebas de cribado de 1ª generación para la detección de anticuerpos anti-VHC no se ha realizado porque se emplearon en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana durante un corto periodo de tiempo (febrero de 1990-febrero de 1991) y las pruebas de confirmación serológica de 1ª generación se introdujeron un poco después, entre julio de 1990 y febrero 1991 en Valencia y Castellón y entre septiembre 1990-febrero 1991 en Alicante.

La especificidad de las pruebas serológicas de cribado de 2ª y 3ª generación se encuentra dentro de los límites adecuados, presentando un 0.23% de resultados falsos positivos las pruebas de cribado de 2ª generación y un 0.16% de resultados falsos positivos las pruebas de cribado de 3ª generación. La diferencia de sensibilidad (0.9977 las pruebas de 2ª generación y 0.9984 las de 3ª) es estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a pesar de que la diferencia es aparentemente pequeña, por lo que se puede afirmar que las pruebas de 3ª generación son más específicas que las pruebas de 2ª generación.

V.3.2. Resultados de las pruebas serológicas de confirmación.

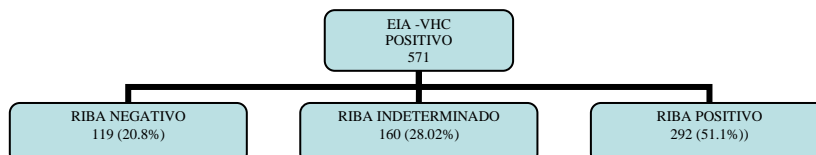
En la Comunitat Valenciana se ha determinado que en el periodo 2000-2002 (esquema 8), el 36% de las donaciones VHC positivas en la prueba de cribado presentan el RIBA positivo y el 24% de estos casos, presentan resultado negativo en las pruebas NAT de detección de ARN-VHC (datos obtenidos mediante la tabla 32 del apartado IV.6 y la tabla 37 del apartado IV.9). Estos resultados obtenidos en la Comunitat Valenciana están en concordancia con los resultados publicados, que indican que entre el 20% y el 50% de las personas infectadas por VHC se recuperan⁶.

Esquema 8: Resultados de las pruebas de confirmación VHC en el periodo 2000-2002 en la Comunitat Valenciana.

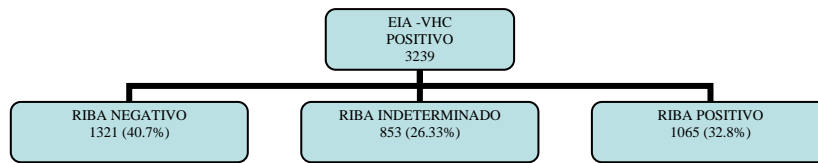


En términos porcentuales, en la Comunitat Valenciana las unidades positivas en la prueba de cribado de 2ª generación fueron RIBA positivo en un 51%, RIBA negativo en un 21% y RIBA indeterminado en un 28%, lo que coincide con los datos publicados^{81, 82} (esquema 9).

Esquema 9: Resultados de las pruebas de confirmación de 2ª generación (1992).



Esquema 10: Resultados de las pruebas de confirmación de 3ª generación (1994-2002).



Analizando los resultados obtenidos con las pruebas de confirmación serológicas de 3ª generación, se observa un aumento de un 20% de los casos falsos positivos (RIBA negativo) y de una disminución de un 20% de los casos VHC confirmados (RIBA positivo) con respecto a las pruebas de confirmación de 2ª generación, que puede deberse a que con la prueba de confirmación de 2ª generación, que comprende el año 1992, se detectaron mayoritariamente casos VHC confirmados de primera vez, mientras que con las pruebas de confirmación de 3ª generación, que comprende un periodo más amplio (1993-2002), se han analizado donaciones de donantes repetidores con resultado falso positivo frente a anticuerpos anti-VHC (esquema 9 y esquema 10).

En la Comunitat Valenciana todos los resultados RIBA indeterminados, fueron ARN-VHC negativo, a partir de la introducción de la prueba genómica de detección de ARN-VHC como prueba de confirmación complementaria. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados en la población de donantes de sangre^{77, 78}.

Las proporciones de los resultados indeterminados obtenidos con las pruebas de 2ª generación (28.02%) y con las pruebas de 3ª generación (26.33%) (esquemas 9 y 10) son similares, no existiendo diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambas pruebas.

V.3.3. Valoración de la utilidad de la determinación de la concentración de actividad de la ALT como marcador indirecto de infección por VHC en donantes de sangre.

En las relaciones entre grupos de estudio, hemos considerado el número de donaciones de sangre totales con ALT alterada y el número de donaciones de sangre totales, en vez de número de donantes totales, asumiendo que un mismo

donante puede haber realizado varias donaciones. Las donaciones de sangre con la ALT alterada se desechan para la transfusión, pero no se excluye al donante para la donación, por lo que dicho donante puede tener varias donaciones de sangre posteriores.

El periodo de estudio considerado comprende de 1992 a 2002, debido a que hubo una reorganización de los datos relativos a donantes por cambio de sistema informático y los datos analíticos de la determinación de ALT a las donaciones realizadas en 1990 y 1991 habrían resultado muy difíciles de recuperar.

El estudio comparativo entre la técnica de concentración de ALT y la técnica NAT en los donantes de sangre VHC confirmados, se realizó en el periodo 2000-2002 en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. En Valencia y Castellón se dispone de datos de la prueba NAT de confirmación desde el año 1996.

En el periodo 1990-1992, de las 83 seroconversiones que hubo para el VHC, en 11 de estas seroconversiones, la donación previa a donación VHC confirmada se desechó por tener la ALT alterada, demostrándose la importancia de la determinación concentración de la ALT en la detección indirecta de la infección por el VHC, en los inicios del cribado de las donaciones frente a anticuerpos anti-VHC con pruebas de 1ª y 2ª generación.

En el periodo 1992-2002, sólo el 28% de los donantes de sangre VHC confirmados como positivos por la prueba serológica RIBA, tenían la prueba de cuantificación de ALT alterada o por encima del límite establecido (69 UI/L ó 49 UI/L).

El 76% de los donantes de sangre confirmados como positivos por la prueba serológica RIBA tienen la prueba genómica de detección del ARN-VHC positivo. El 27% de estos donantes de sangre (RIBA positivo y PCR positivo) tenían la prueba de cuantificación de ALT alterada.

En el periodo 2000-2002, el 98% de los donantes VHC confirmados como positivos por la prueba RIBA con la prueba ALT alterada fueron PCR positivo.

Por lo tanto la determinación de ALT en ausencia de las pruebas serológicas de cribado, sólo detectarían el 28% de las infecciones por VHC en los donantes de sangre. Estas donaciones de sangre confirmadas como VHC

positivas, también serían PCR ARN-VHC positivas, ya que el 27% de las donaciones RIBA positivo y PCR positivo tienen la ALT alterada. Estos resultados están en concordancia con los datos publicados⁶¹, en los que se expone que la determinación de ALT en ausencia de pruebas de cribado de detección de anticuerpos anti-VHC, evitaría un tercio de las infecciones por VHC por transfusión.

De los cuatro donantes detectados en el periodo ventana serológico de VHC desde la puesta en marcha de las pruebas NAT de detección de ARN-VHC en el cribado de donaciones de sangre (periodo 1999-2006), en tres de ellos la prueba de cuantificación de ALT estaba alterada, por lo que en ausencia de las pruebas NAT de cribado se hubieran detectado por la determinación de la ALT y se hubieran desechado para la transfusión. Esto implica que las ALT están alteradas en los periodos iniciales de la enfermedad⁶¹, pero con la introducción de las pruebas genómicas de cribado, estos casos también se detectarían por dichas técnicas^{61, 62}.

Con la introducción de las pruebas de 3ª generación y las pruebas NAT se ha acortado el periodo ventana de la infección por VHC, disminuyendo el valor de la determinación de las ALT^{61, 62}. Además posteriores estudios⁶³, han demostrado que otros virus transmisibles por transfusión que no se detectan en el cribado de las donaciones de sangre, no se detectan más frecuentemente en donantes de sangre con la ALT alterada.

Por todos los hechos expuestos anteriormente se llegó a la decisión en julio de 2006 por la Agencia española del medicamento, basándose en las recomendaciones de la Agencia Europea para el Control de los Medicamentos (EMA)⁶⁷, de eliminar la detección de la concentración de las ALT en las donaciones de sangre.

En el periodo 1992-2002, el 2% de las donaciones de sangre se han desechado por tener la concentración de ALT elevada y solamente el 1.3% de las donaciones con la concentración de ALT elevada fueron confirmadas como VHC positivas. Por lo tanto, probablemente se han desechado la mayoría de estas donaciones sin presentar ningún riesgo para la transfusión.

V.3.4. Prevalencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en el periodo 1991-2002.

1. Se ha determinado la prevalencia de infección por VHC anual en el periodo (1991-2002) en la población de donantes de sangre de Alicante, Valencia y Castellón y la Comunitat Valenciana, teniendo en cuenta solamente a los donantes nuevos, con una donación con resultado positivo en la prueba de cribado de detección de anticuerpos VHC y confirmada como positiva mediante la prueba serológica complementaria.

2. La prevalencia anual del año 1990 no se ha determinado debido a que los resultados repetidamente reactivos para la prueba de cribado VHC de 1ª generación no se pudieron confirmar hasta julio de 1990 en Valencia y Castellón y hasta septiembre de 1990 en Alicante, fechas en que se introdujo la prueba de confirmación VHC de 1ª generación en cada Centro de Transfusión.

3. La prevalencia de VHC en el periodo 1991-2002, en las provincias de Valencia y Castellón ha ido disminuyendo año a año, salvo dos aumentos en 1992 y 1995. En la provincia de Alicante también ha ido disminuyendo la prevalencia de VHC en el periodo 1991-1999, salvo dos incrementos en 1993 y en el año 2000.

4. En el periodo 1991-1999, salvo en el año 1993, la prevalencia de infección por VHC en las provincias de Valencia y Castellón, fue superior a la de la provincia de Alicante, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), mientras que en los años 2000, 2001 y 2002, las diferencias entre la prevalencias de infección en la provincia de Alicante y las provincias de Valencia y Castellón no son estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

5. En el periodo de estudio (1991-2002) ha ido disminuyendo la prevalencia de VHC debido a la puesta en marcha de las pruebas serológicas y genómicas de cribado del VHC cada vez más sensibles y específicas, por la introducción de los métodos de inactivación de los hemoderivados, por la exclusión de la donación de los donantes de riesgo de transmitir el VHC y por la información recibida por la población general sobre las vías de contagio de la infección por VHC.

6. La prevalencia de la infección por VHC en la población de donantes de sangre en la Comunitat Valenciana, comparada con otros países en los mismos periodos de tiempo, se muestra en la tabla 79.

Tabla 79: Prevalencia de la infección por VHC por 10³ donantes de sangre en distintos países y la Comunitat Valenciana en distintos periodos de tiempo.

PERIODO	1996-2002	1997	1995-2000	1999-2001	2001-2002
Alicante	2.69	2.64	2.71	3.21	3.02
Valencia y Castellón	3.90	5.02	5.01	2.49	2.51
Comunitat Valenciana	3.59	4.39	4.37	3.01	2.68
España ⁹⁴				2.05	
Estados Unidos ^{146, 155, 156}	3.94	4.51	4.66	4.73	3.23
Europa ¹⁴⁶		1.19			
Japón ¹⁵⁷			4.9		

La prevalencia de infección por VHC en los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana es similar a la de países como Estados Unidos o Japón en los periodos estudiados, menos en el periodo 1999-2001 donde fue inferior a la prevalencia de infección en Estados Unidos. La prevalencia de infección por VHC en los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana fue superior al resto de España, Escandinavia, Francia, Alemania, Suiza y Reino Unido en los periodos estudiados.

7. No se dispone de datos sobre la prevalencia de la infección por el VHC en la población general de la Comunitat Valenciana. Aunque sí se dispone de datos sobre la prevalencia de la infección en los distintos Centros Hospitalarios de la Comunitat Valenciana (tabla 80).

Tabla 80: Prevalencia de la infección por VHC por 10³ personas en los Centros Hospitalarios de la Comunitat Valenciana y en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

Año	1998	1999	2000	2001	2002
Prevalencia VHC en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana	4.17	3.17	3.20	2.65	2.70
Prevalencia VHC en los Centros Hospitalarios de la Comunitat Valenciana ^{158, 159}	0.058	0.027	0.020	0.018	0.016

La prevalencia de infección por VHC en donantes de sangre aproximadamente 100 veces superior a la prevalencia observada en los Centros Hospitalarios debido a que la determinación de la técnica de detección de anticuerpos anti-VHC en estos últimos se realiza como diagnóstico de infección por VHC y en el Centro de Transfusión se realiza como técnica de cribado a todos los donantes de sangre. En el periodo 1998-2002 tanto en el Centro de Tranfusión como en los Centros Hospitalarios de la Comunitat Valenciana ha ido disminuyendo la prevalencia de la infección por VHC.

8. La prevalencia de infección por VHC en la población de donantes de sangre es menor que la prevalencia de dicha infección en la población general, debido a que los donantes de sangre son generalmente una población altamente seleccionada. No se dispone de datos sobre la prevalencia de infección por VHC en la población general de la Comunitat Valenciana, pero sí se dispone de datos de prevalencia de otras regiones de España y del mundo (tabla 81 y tabla 82).

Tabla 81: Prevalencia estimada de Hepatitis C en la población general en distintas regiones de España.

Regiones España	Prevalencia (%)
Castilla y León ^{160, 161}	0.74 y 1.10
Asturias ^{162, 163}	1.60 y 1.70
Cataluña ^{164, 165}	1.80 y 2.64
La Rioja ¹⁶⁶	2.00
España ¹⁷	1.60-2.60

Tabla 82: Prevalencia estimada de Hepatitis C en la población general en el área OMS. Fuente: Informe epidemiológico semanal. N° 49, 10 de diciembre de 1999, OMS¹⁶.

Area OMS	Prevalencia (%)
África	5.3
América	1.7
Mediterráneo Oriental	4.6
Europa	1.03
Sudeste asiático	2.15
Pacífico occidental	3.9
Total	3.1

La prevalencia de la infección por VHC en los donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en 2002 es aproximadamente 10 veces inferior a la

prevalencia de infección por VHC en la población general del resto de España y de países con un desarrollo socioeconómico similar.

Los estudios de prevalencia de infección por VHC en la población general en España son escasos y referidos a pocas regiones, no existiendo en la Comunitat Valenciana. Deberían de realizarse estos estudios en regiones donde no se han realizado para obtener datos epidemiológicos fiables en la población general.

Viendo la evolución de la prevalencia de VHC en donantes de sangre en el periodo 1990-2002, sería importante un estudio sobre la prevalencia de VHC en la población general para comprobar que la disminución observada en la prevalencia de VHC en los donantes de sangre en dicho periodo, también se ha producido en la población general.

V.3.5. Tasas crudas y corregidas de incidencia de infección por VHC en donantes de sangre de la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.

1. La tasa cruda de incidencia no tiene en cuenta la seguridad adicional que proporciona a la distribución de hemoderivados la realización de marcadores indirectos de infección y la posibilidad de autoexclusión por parte de los donantes. Así, en el cálculo de la tasa corregida de incidencia, se eliminan del numerador los casos incidentes cuyas donaciones seronegativas previas no fueron aptas para uso transfusional, por haber presentado un resultado falso positivo en las pruebas de cribado, un valor de ALT alterado o por autoexclusión del donante y se calcula de nuevo la cantidad donante-años en riesgo, incluyendo para este cálculo sólo a los donantes repetidores durante el periodo de tiempo de estudio cuya primera donación se consideró apta para transfundir⁷⁰, por tanto la tasa corregida de incidencia se ajusta más a la realidad.

2. Las tasas crudas y corregidas de incidencia se han calculado para los distintos periodos de estudio (1990-1992, 1993-1995, 1996-1998, 1997-1999 y 2000-2002) siendo el número de seroconversiones iguales para el cálculo de los dos tipos de tasa de incidencia en todos los periodos de estudio menos en el primero (1990-1992) en el cual el número de seroconversiones utilizado para el

cálculo de la tasa corregida de incidencia fue menor que el número de seroconversiones utilizado en el cálculo de la tasa cruda de incidencia en el Centro de Transfusión de Valencia, debido a que hubieron 22 donaciones previas a las donaciones VHC positivas, que se desecharon por problemas ajenos a la infección por VHC. En los demás periodos de estudio, donde las seroconversiones coinciden para el cálculo de ambas tasas de incidencia, la diferencia entre los valores de la tasa corregida y cruda de incidencia no es apreciable.

3. La tasa corregida de incidencia para el periodo 2000-2002 no se calculó porque se utilizó otro programa informático proporcionado por el Centro de Transfusión de Granada, el cual no tuvo en cuenta la última donación no apta para la transfusión, calculando solamente la tasa cruda de incidencia.

4. Hay una disminución acusada de la tasa corregida y cruda de incidencia de la infección por VHC desde el periodo 1990-1992 al periodo 1993-1995 en la Comunitat Valenciana, que se debe principalmente al paso de las pruebas de cribado serológicas de 1ª y 2ª generación utilizadas en el periodo 1990-1992, a las pruebas de cribado serológicas de 3ª generación utilizadas a partir de 1993.

5. Los valores de las tasas corregidas y crudas de incidencia en las provincias de Valencia y Castellón en cada periodo de estudio han sido mayores que en la provincia de Alicante. En los periodos 1990-1992, 1993-1995 y 2000-2002 la tasa cruda de incidencia de las provincias de Valencia y Castellón fue dos veces superior a la tasa cruda de incidencia de Alicante. En el periodo 1997-1999, la tasa cruda de incidencia de Valencia y Castellón fue cuatro veces superior a la de Alicante.

6. Las tasas corregidas de incidencia en la Comunitat Valenciana en los diferentes periodos de estudio con respecto a otros países se exponen en la tabla 83.

Tabla 83: Tasas corregidas de incidencia por 10⁵ personas-año de distintos países y la Comunitat Valenciana en periodos de tiempo determinados.

PERIODO	1993-1995	1996-1998	1997	1997-1999	1996-2000	1999-2000	2000-2001(2002)*
Alicante	8,04	N.D		2,41			2,07
Valencia y Castellón	15,79	14,23		9,85			3,94
Comunitat Valenciana	13,60	10,29		7,83		4,44 ¹³	3,42
España ^{94, 146, 167}				3,70		2,16	2,18
Estados Unidos ^{72, 156}					2,90	2,00	1,9
Francia ¹⁶⁸	2,48	2,00		1,07			
Italia ¹⁶⁹		4,77		3,93	4,10	3,10	
Europa Central ⁷²			2,3				
EPFA ^{**72, 146}			0,9				

(*)Tasas crudas de incidencia en el periodo 2000-2002 en la Comunitat Valenciana y España y tasas corregidas de incidencia en el periodo 2000-2001 en Estados Unidos.

(**) EPFA: European Plasma Fractionation Association (Dinamarca, Inglaterra, Gales, Finlandia, Alemania y Suiza)

Las tasas corregidas de incidencia en la Comunitat Valenciana son superiores a las tasas corregidas de incidencia de Estados Unidos, Francia, Italia, Europa Central, Dinamarca, Finlandia, Inglaterra, Gales, Alemania, Suiza y de la totalidad de España en los mismos periodos de estudio, y son congruentes con las diferencias existentes con la prevalencia, aunque la prevalencia de infección por VHC en la Comunitat Valenciana fue similar a la prevalencia encontrada en Estados Unidos.

En el periodo 1996-1998 no hubieron casos incidentes de VHC en Alicante y la tasa corregida de incidencia de Alicante en el periodo 1997-1999 fue cuatro veces inferior a la tasa corregida de incidencia de Valencia y Castellón y casi dos veces inferior a la tasa de incidencia de toda España. Esto demuestra que la Comunitat Valenciana y en concreto las provincias de Valencia y Castellón, la tasa de incidencia de infección por VHC en la población de donantes de sangre es alta y que pueden haber diferencias apreciables entre provincias limítrofes¹²⁹.

V.3.6. Estimación del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio.

1. La estimación del riesgo residual se ha determinado para los distintos periodos de estudio teniendo en cuenta tanto la tasa corregida como la tasa cruda de incidencia para dichos periodos.

2. La duración del periodo de ventana utilizado en cada periodo de estudio para el cálculo del riesgo residual, se ha obtenido mediante los datos bibliográficos correspondientes a las pruebas serológicas empleadas.

3. En el último periodo de estudio (2000-2002) se ha determinado también el riesgo residual resultante del empleo de las pruebas NAT de cribado. La duración del periodo ventana que se ha utilizado en esta estimación ha sido el más alto encontrado en la bibliografía referente a la utilización de *pools* de unidades de sangre^{62, 72}, debido a que en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana, desde el principio, se han empleado en mayor parte *pools* de 44 unidades de sangre para la determinación del ARN-VHC.

4. En la Comunitat Valenciana se ha pasado de un riesgo residual de infección por VHC de 1 en 5702 unidades de sangre en el periodo 1990-1992 a un riesgo residual de infección de 1 en 892857 unidades de sangre en el periodo 2000-2002. Esta disminución tan grande es debida principalmente a la mejora en las pruebas de cribado, donde se ha pasado de utilizar las pruebas serológicas de cribado de 1ª y 2ª generación en el periodo 1990-1992 a la utilización de las pruebas genómicas de cribado en *pools* de unidades de sangre en el periodo 2000-2002.

5. El riesgo residual de transmisión de la infección por VHC en la población de donantes de sangre en la Comunitat Valenciana, comparada con otros países en los mismos periodos de tiempo, se muestra en la tabla 84.

Tabla 84: Riesgo residual de transmisión de VHC por 10⁶ donaciones de sangre en distintos países en periodos de tiempo determinados.

PERIODO	1993-1995	1996-1998	1997	1997-1999	1996-2000	1999-2000**	2000-2001(2002)*
Alicante	14.54	N.D		4.36			3.75 / 0.68
Valencia y Castellón	28.55	25.73		17.81			7.13 / 1.30
Comunitat Valenciana	24.59	18.61		14.16		8.03 / 1.22 ¹³	6.19 / 1,12
España ^{94, 146, 167}				6.69		3.91 / 0.59	3.94/N.D
Estados Unidos ⁷²					5.6		3.6 / 0.5
Francia ¹⁶⁸	4.48	2.68		1.94			
Italia ¹⁶⁹		9.0		7.5	7.9	5.9 / N.D***	
Europa Central ⁷²			4.2				
EPFA ^{***72, 146}			1.6				

(*) Riesgo residual por el empleo de pruebas serológicas de 3^a generación y riesgo residual por el empleo de pruebas genómicas de cribado en el periodo 2000-2002 en la Comunitat Valenciana y España y en el periodo 2000-2001 en Estados Unidos.

(**) Riesgo residual por el empleo de pruebas serológicas y riesgo residual por el empleo de pruebas genómicas de cribado.

(***) No determinado.

(****) EPFA: European Plasma Fraccionation Association (Dinamarca, Inglaterra, Gales, Finlandia, Alemania y Suiza)

El riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana es superior al riesgo residual de Estados Unidos, Francia, Italia, Europa Central, Dinamarca, Finlandia, Inglaterra, Gales, Alemania, Suiza y el resto de España en los mismos periodos estudiados, de la misma manera que fue superior la tasa de incidencia y son congruentes con las diferencias existentes en la prevalencia. En la comparación del riesgo residual de la Comunitat Valenciana con el resto de países hay que tener en cuenta que los resultados en la Comunitat Valenciana provienen de la totalidad de las donaciones de sangre y los resultados del resto de países no. Este hecho hace que los resultados se adapten más a la realidad de la población general⁷⁰.

V.3.7. Estimación de la reducción del riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana con la introducción de nuevas pruebas de cribado.

1. El número de unidades potencialmente infecciosas, por cada millón de unidades transfundidas, que serían desechadas debido a la introducción de las pruebas NAT para la detección de ARN-VHC (reducción del riesgo residual o rendimiento relativo), se ha obtenido por la diferencia entre la estimación del riesgo residual con la utilización de las pruebas de cribado serológicas y la estimación del riesgo residual con la utilización de la prueba NAT de cribado, en el último periodo de estudio (2000-2002). Este resultado puede obtenerse también multiplicando la tasa cruda de incidencia de ese periodo de estudio, por la reducción del periodo ventana, expresado en fracción de año, que se consigue con la introducción de la prueba NAT.

2. Este rendimiento relativo de la introducción de las pruebas NAT como prueba de cribado se ha estimado con las tasas crudas de incidencia del último periodo de estudio (2000-2002) en el que se introdujo dicha técnica en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

3. El rendimiento observado con la introducción de las pruebas NAT como prueba de cribado se ha obtenido contabilizando las unidades de sangre que han presentado anticuerpos VHC negativo y el ARN-VHC positivo en las pruebas de cribado.

4. El rendimiento relativo se ha comparado con el rendimiento observado en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en los periodos de estudio (1999-2002) y (1999-2006). Este rendimiento relativo estimado para el periodo (2000-2002) también se ha comparado con el rendimiento observado con la introducción de las pruebas NAT en España, en el periodo (1996-2003) con los datos provenientes de la industria de fraccionamiento del plasma y en el periodo de estudio (1999-2006) con los datos proporcionados por los centros de transfusión del resto de España.

Los datos provenientes de la industria de fraccionamiento del plasma son del periodo (1996-2003) porque dicha industria empezó a analizar a todas las unidades de sangre por las técnicas NAT de detección del ARN-VHC en 1996.

Los datos provenientes de los Centros de Transfusión españoles fueron proporcionados por los mismos centros y abarcan el periodo 1999-2006. Para evitar el solapamiento de los casos observados por los centros de transfusión y los casos observados por la industria de fraccionamiento del plasma, se ha determinado el rendimiento observado por la industria, sin las unidades de sangre analizadas por los centros de transfusión en el periodo 1999-2003, ya que las unidades de sangre en periodo ventana detectadas por los centros de transfusión no se han enviado a la industria de fraccionamiento.

5. El rendimiento observado por la introducción de las técnicas NAT en el cribado de las unidades de sangre en la Comunitat Valenciana tanto en el periodo 1999-2002 como en el periodo 1999-2006 es similar al rendimiento esperado en el periodo 2000-2002.

6. La comparación del rendimiento esperado por las técnicas NAT y el rendimiento observado entre la Comunitat Valenciana y otros países se muestra en la tabla 85.

Tabla 85: Comparación entre el rendimiento NAT esperado y el rendimiento NAT observado por 10⁶ donaciones en la Comunitat Valenciana y distintos países en distintos periodos de tiempo.

PAÍS	PERIODO	Rendimiento NAT esperado por 10 ⁶ donaciones	Rendimiento NAT observado por 10 ⁶ donaciones
COMUNITAT VALENCIANA	2000-2002	5.07	3.47/3.12*
ESPAÑA ¹⁶⁷	2000-2002	2.58	2.37/2.15*/4.04**
ITALIA ¹⁷⁰	2001-2003	2.20	1.79
FRANCIA ⁶⁸	1998-2000	1.00	0.60
ESTADOS UNIDOS ⁷²	2000-2001	3.10	2.60
EUROPA CENTRAL ⁷²	1997	3.80	1.70

(*) Rendimiento NAT observado en el periodo 1999-2006 por Centros de Transfusión.

(**) Rendimiento NAT observado en el periodo 1996-2003 por la Industria de fraccionamiento del plasma.

Existe un paralelismo entre los resultados del rendimiento NAT esperado y del rendimiento NAT observado en países con tasas de incidencia distintas.

El rendimiento observado de las pruebas NAT de cribado en la Comunitat Valenciana es superior al rendimiento observado de las técnicas NAT por países

de Europa central, Francia e Italia y ligeramente superior al rendimiento observado en Estados Unidos y resto de España. Este hecho puede deberse a que la tasa de incidencia de la infección por VHC en la Comunitat Valenciana es también mayor.

El rendimiento observado en España de 4.04 por millón de donaciones en el periodo 1996-2003 fue proporcionado por la industria de fraccionamiento del plasma en España y es mayor que el rendimiento observado en la Comunitat Valenciana, quizá porque abarca un periodo más amplio.

V.3.8. Sensibilidad de la prueba NAT de cribado.

1. La sensibilidad de la técnica fue un parámetro de análisis en la valoración de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche como prueba de cribado de las unidades de sangre. Se compararon los resultados de sensibilidad obtenidos en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana con los resultados obtenidos por todos los centros participantes en la evaluación multicéntrica de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche. La sensibilidad de la prueba NAT (RT-PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche) por el método estándar de preparación de muestras o método para trabajar con muestras individuales obtenida en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana fue superior a la obtenida por el resto de centros de transfusión españoles que participaron en la evaluación de la técnica y cumple con los requisitos exigidos por la OMS para el uso de las técnicas NAT para la detección de ARN-VHC en *pools* de unidades (100 UI/ml).

2. Los resultados de sensibilidad de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche están obtenidos por el procedimiento estándar. En este procedimiento estándar no se realiza la concentración de partículas víricas del plasma por centrifugación a 23600 g como paso previo a la extracción del ARN-VHC (procedimiento multiprep). Si se hubiera realizado el paso previo de centrifugación del plasma por el que se procesan los *pools* de unidades de sangre, la probabilidad de detección al 95 % se incrementa en 3,4 veces al obtenido por el procedimiento estándar, según resultados obtenidos por Eiras et al⁹⁴.

3. Los límites de detección del ARN-VHC de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche se calcularon con una probabilidad del 50% del 95% y un intervalo de confianza al 95% (IC 95%) mediante un análisis Probit. En la tabla 86 se muestran los datos obtenidos en la Comunitat Valenciana comparados con otros centros de transfusión españoles:

Tabla 86: Límite de detección al 95% y al 50% de la técnica PCR Cobas Ampliscreen de Roche por el método estándar, obtenido por el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana y por el conjunto de centros de transfusión españoles.

	Límite de detección ARN-VHC (50%) UI/ml	Límite de detección ARN-VHC (95%) UI/ml
Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana	7.3 (5.2-9.2)	23 (18-50)
Conjunto de centros de transfusión españoles⁹⁴	12 (10-14)	69 (56-94)

4. La sensibilidad de la técnica RT PCR por el procedimiento multiprep para la extracción de ARN-VHC en mezclas de plasma, en el que se realiza la concentración de partículas víricas del plasma por centrifugación a 23600 g como paso previo a la extracción del ARN-VHC, con los datos obtenidos por todos los centros de transfusión españoles al 95% mediante análisis Probit realizado por el Centro de Transfusión de Galicia⁹⁴ está expuesto en la tabla 87:

Tabla 87: Límite de detección al 95% de la técnica PCR Cobas Ampliscreen por el método multiprep para mezclas de plasma.

	Límite de detección ARN- VHC (95%) UI/ml
Centros de transfusión españoles⁹⁴	20 (11-53)

Este límite de detección de la técnica al 95% de 20 UI/ml implica que en *pools* de 44 unidades de sangre se detectaría una donación ARN-VHC positiva de 880 UI/ml y en *pools* de 22 se detectaría una donación ARN-VHC positiva de 440 UI/ml. Estos límites de detección de la técnica para trabajar en *pools* o

mezclas de plasma de 44 ó 22 unidades de sangre cumplen con los requerimientos internacionales de sensibilidad de la EMEA y la FDA para la utilización de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos en el cribado de unidades de sangre para la detección de ARN-VHC (100 UI/ml) ^{112, 113}.

V.3.9. Determinación de la fiabilidad de la técnica NAT de cribado.

1. En la valoración de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 de Roche se ha determinado la fiabilidad de esta técnica considerando la etapa inicial de implantación de dicha técnica (julio 1999-diciembre 2001) en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

2. Los *pools* se consideraron no válidos cuando el control interno tenía resultado negativo y las series se consideraron no válidas cuando el control positivo tenía resultado negativo o el control negativo tenía resultado positivo. Los *pools* se consideraron inicialmente reactivos cuando tenían el resultado positivo en la prueba genómica de cribado y resultaban negativos en la repetición mediante el cruce de damero.

3. En el número total de *pools* analizados en el periodo (julio 1999-diciembre 2001) están contabilizados tanto los *pools* de 44 unidades de sangre como los *pools* de 22 unidades de sangre.

4. Todos los resultados invalidados y los resultados inicialmente positivos cuando se repitieron resultaron negativos.

5. La fiabilidad de la técnica NAT, determinada mediante análisis de los *pools* invalidados por el control interno, *pools* inicialmente reactivos y listas de trabajo invalidadas durante el periodo inicial de puesta en marcha de dicha técnica (1999-2001) y comparada con los resultados de los demás centros de transfusión (enero 2000-junio 2001) se muestra en la tabla 88.

Tabla 88: Comparación de la fiabilidad de la técnica PCR Cobas Ampliscreen HCV 2.0 en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana y en los demás centros de transfusión españoles.

	<i>Pools</i> invalidados (%)	<i>Pools</i> inicialmente reactivos (%)	Listas de trabajo invalidadas (%)
Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana	2,57	0.46	5,33
Centros de transfusión españoles⁹⁴	1,50	N*	3,70

(*) N: No realizado

El número de *pools* invalidados por el control interno negativo y las listas de trabajo invalidadas por fallo en los controles positivos o negativos, es mayor en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana que en el resto de centros de transfusión españoles porque los datos abarcan desde la puesta en marcha de la técnica NAT en junio de 1999 hasta diciembre de 2001 y los datos de los centros de transfusión españoles comprenden desde enero de 2000 hasta junio de 2001⁹⁴, esto quiere decir que en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana están contabilizados los siete meses iniciales del funcionamiento de la técnica RT-PCR, donde el porcentaje de *pools* invalidados por el control interno negativo y de listas de trabajo invalidadas fue mayor por la falta de familiarización de los técnicos de laboratorio con las tecnologías basadas en Biología Molecular, como es la técnica RT-PCR, mientras que en los datos de los centros de transfusión españoles no se han contabilizado estos siete meses iniciales.

El número de *pools* inicialmente reactivos fue de un 0,46%. Estos *pools* inicialmente reactivos no se confirmaron al repetirse una segunda vez.

V.3.10. Determinación de los tiempos de proceso y los recursos humanos necesarios para la introducción de la técnica NAT de cribado.

El tiempo medio de las técnicas semiautomáticas de detección de ácidos nucleicos, incluyendo la preparación de las mezclas de plasma, es de 9 a 10 horas (tabla 73 del punto IV.18.3), de forma que el Centro de Transfusión de Valencia y el de Alicante han tenido que variar su sistema de trabajo, realizando las pruebas de serología por las noches, para permitir la exclusión de las unidades positivas de las mezclas de plasma que van a ser analizados por NAT^{90, 107}. Así, se formaron diez personas para realizar la prueba NAT de cribado de detección de ARN-VHC, cuatro en Valencia y seis en Alicante. El hecho de tener más gente formada en la realización de esta técnica en el Centro de Transfusión de Alicante se debe a que este centro emplea tres turnos diarios de trabajo (22 h-8h, 8h-15h y 15h-22h) y el Centro de Transfusión de Valencia solo dos (22h-8h y 8h-15h).

En caso de tener que repetir un *pool* positivo o invalidado por el control interno, se valoran las necesidades del centro según la entrada de unidades de sangre del día y del trabajo programado en el fraccionamiento de los hemoderivados, pudiendo repetirse la prueba genómica la misma tarde del día de proceso o al día siguiente.

Las bolsas de sangre llegan al Centro de Transfusión a las 22 horas y se liberan a las 15 horas del día siguiente al de la extracción de sangre. Por lo tanto la técnica NAT se adapta al funcionamiento del Centro de Transfusión.

V.3.11. Seguimiento de los donantes de sangre en periodo ventana serológico detectados en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana.

1. Se han detectado cuatro donantes de sangre en periodo ventana serológico para el VHC en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana entre 1999 y 2006. Los dos primeros casos se detectaron en el Centro de Transfusión de Valencia en el periodo (1999-2001) y los dos siguientes se

detectaron en el Centro de Transfusión de Alicante en el periodo (2004-2005)¹⁴⁹,
150.

2. Tres donantes de sangre en periodo ventana para VHC eran donantes habituales y uno era donante nuevo.

3. El perfil de los donantes de sangre en periodo ventana serológico de infección VHC se resume en la tabla 78 del punto IV.19^{149, 150}.

Tabla 78: Casos de ARN-VHC positivo con anticuerpos VHC negativo en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2006.

Donante	Sexo	Edad	Tipo de donante	ARN-VHC/mL	Genotipo VHC	ALT (U/L)	Seroconversión	Vía de contagio
1	Varón	21	Habitual	10 ^{4.8}	3a	12	≤5 meses	¿?
2	Varón	44	Nuevo	10 ^{6.9}	1a	70	no	¿?
3	Mujer	39	Habitual	10 ^{6.0}	1a	62	≤1 mes	¿?
4	Varón	32	Habitual	10 ^{5.1}	1a	526	≤1 mes	¿?

A los tres donantes habituales se les pudo realizar un seguimiento hasta la seroconversión, siendo de menos de un mes en dos de los donantes y de cuatro meses en el otro donante.

Tres donaciones en periodo ventana de infección por VHC tuvieron alteradas las concentraciones de ALT, con lo que en caso de no haberse utilizado la técnica NAT en el cribado de las donaciones de sangre se hubieran detectado por la prueba de cuantificación de ALT.

La duración del periodo de ventana serológica de un donante habitual (donante 1) ha sido superior (93 a 149 días) al considerado estándar para el periodo ventana de las pruebas serológicas de 3ª generación, 66 (38 a 94) días⁷¹. El límite superior del intervalo de la duración del periodo ventana del donante 1 hemos hallado a partir de la fecha de su última donación negativa para marcadores infecciosos del VHC hasta la fecha de la detección de los anticuerpos anti-VHC por la prueba de cribado y el límite inferior lo determinamos desde la fecha donación en periodo ventana hasta la fecha de la seroconversión. El intervalo del periodo ventana considerado estándar lo determinamos mediante la bibliografía. En los otros dos donantes habituales el periodo ventana serológico ha sido inferior (<30 días) al considerado estándar (66 días).

Las cuatro donaciones en periodo ventana serológico para VHC fueron detectadas en *pools* de 44 unidades de sangre demostrándose la sensibilidad

adecuada de la técnica RT PCR Ampliscreen HCV 2.0 para trabajar en *pools* de unidades de sangre (tabla 89).

Tabla 89: Sensibilidad de la técnica PCR empleada en el cribado de donaciones de sangre en *pools* de 44 unidades.

	Carga vírica (UI/mL)	Carga vírica en pool de 44 unidades de sangre (UI/mL)	Límite de detección (95%) de la técnica NAT en pool de 44 (UI/ml) ¹³
Donante 1	63096	1434	880
Donante 2	7,9 x 10 ⁶	172727	880
Donante 3	1,0 x 10 ⁶	22727	880
Donante 4	125893	2861	880

Los cuatro donantes en periodo ventana serológico de VHC, tienen unos genotipos de VHC (3a, 1a) que no son los más prevalentes en España (1b)¹⁵. Sin embargo los genotipos 1a y 3a son igual de prevalentes que el genotipo 1b en España, entre las personas nacidas a partir de 1950¹⁵.

En cuanto a la vía de contagio de la infección VHC en los donantes de sangre en periodo ventana serológico para VHC, ninguno de ellos declaró haber estado expuesto a alguna situación de riesgo de contagio. Sólo uno declaró cierta promiscuidad sexual meses previos a la seroconversión, aunque esta vía de contagio no es común. En contactos con múltiples parejas sexuales la transmisión de VHC puede ocurrir con un riesgo alrededor del 5%⁶.

De los hemoderivados distribuidos a los hospitales e industria de fraccionamiento del plasma de las donaciones de sangre aptas para la transfusión, previas a la donación ARN-VHC positiva, de los donantes en periodo ventana serológico, no se han comunicado contagios en los receptores.

A dos de los cuatro donantes en periodo ventana serológico se les realizaron como prueba adicional las pruebas serológicas de detección del antígeno, tanto la cualitativa de 1^a generación como la cuantitativa de 2^a generación, comprobándose que la técnica de detección del antígeno VHC de 1^a generación es menos sensible que la prueba NAT empleada. En cambio la técnica de detección del antígeno VHC de 2^a generación pudo detectar ambas donaciones en periodo ventana siendo una alternativa a las pruebas NAT en *pools* de unidades de sangre^{59, 149}.

V.3.12. Casos de hepatitis C asociados a transfusión sanguínea en el periodo 1990-2002.

1. El 33% de los estudios de hepatitis C asociados a transfusión no se han podido concluir por la no localización, no comparecencia o muerte del donante de sangre.

2. Se han determinado 13 casos posibles de Hepatitis C asociados a transfusión en la Comunitat Valenciana, que corresponde al 13% de los casos en los que se ha podido concluir el estudio. Estos casos corresponden a donaciones de sangre hechas antes de la puesta en marcha de la prueba de cribado de detección de anticuerpos VHC en febrero de 1990 y a donaciones de sangre realizadas durante el año 1990 y 1991 que fueron analizadas con reactivos de 1ª generación.

3. Once de los donantes de sangre implicados en la posible transmisión de VHC se confirmaron como positivos para infección por VHC, entre 4 meses y 2 años después de la donación implicada. Dos donantes de sangre implicados en dos casos probables de transmisión de VHC se confirmaron como positivos para infección por VHC a los diez y doce años respectivamente, periodo suficientemente largo para haberse infectado posteriormente a la donación implicada.

V.3.13. Número de seroconversiones para el VHC comunicadas por los Centros de Transfusión de la Comunitat Valenciana a los centros receptores de hemoderivados de donaciones previas a la seroconversión en el periodo 1999-2002.

1. De las 17 seroconversiones habidas en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana en el periodo 1999-2002 se han transfundido en los centros hospitalarios 27 hemoderivados. El 52% de los receptores de estos hemoderivados fallecieron por su enfermedad de base y dos receptores de hemoderivados no se pudieron localizar.

2. Los 13 envíos de plasma a la industria de fraccionamiento de las donaciones previas a las seroconversiones para VHC fueron notificadas como

negativas por dicha industria.

3. Un caso de posible transmisión de VHC se ha comunicado por los centros hospitalarios, que corresponde a un donante cuya donación de 2002 fue confirmada positiva frente a marcadores VHC. El estudio de la donación previa de enero de 1992 determinó que dicha donación se desechó al tener resultado indeterminado en la prueba de confirmación de 2ª generación. El estudio de un receptor de la donación previa de abril de 1991, reveló el posible contagio. Esta donación previa se analizó con la prueba de cribado serológico de 1ª generación para la detección de anticuerpos VHC. El estudio de este caso puede indicar la poca sensibilidad de la prueba serológica de cribado de 1ª generación y la poca especificidad de la prueba de confirmación serológica de 2ª generación respecto a los reactivos de detección de anticuerpos VHC de 3ª generación.

En el estudio de los trece posibles casos de hepatitis C postransfusional en el periodo 1990-2002 y del posible caso de contagio de hepatitis C con una donación de sangre apta previa a una seroconversión, podemos concluir que dichos contagios se produjeron cuando no se utilizaban las pruebas serológicas de cribado de detección de anticuerpos anti-VHC o se utilizaban las pruebas serológicas de cribado de 1ª generación de menor sensibilidad respecto a las pruebas de 2ª y 3ª generación.

VI. CONCLUSIONES

1. Desde 1991 hasta 2002, la prevalencia de la infección por VHC en la población de donantes de sangre de la Comunitat Valenciana ha disminuido un 66%, estando en el último año (2002) alrededor del 0.27%. En general, la prevalencia en nuestra Comunidad es superior a la de otras comunidades españolas, así como a la de otros países europeos, y similar a la de Estados Unidos y Japón.

2. Desde 1991 hasta 2002 la tasa cruda de incidencia de infección por VHC en la población de donantes de sangre de la Comunitat Valenciana ha disminuido casi 30 veces, llegando a un valor de 3.4×10^5 donante-años. Sin embargo estos valores, y los de las tasas corregidas son superiores a las estimadas para otras comunidades de España, otros países europeos y Estados Unidos.

3. El riesgo residual de transmisión de VHC por hemoderivados en la Comunitat Valenciana ha ido disminuyendo desde 1991 hasta 2002, llegando a valores de 1.12×10^6 donaciones, superiores a los estimados en otros centros de transfusión españoles, europeos y de Estados Unidos.

4. La disminución del riesgo residual de transmisión de VHC se ha debido a la introducción de nuevas y más sensibles pruebas de cribado para la detección de infección por VHC: Inmunoanálisis de 3ª generación y, principalmente y en los últimos años, las pruebas de detección genómica del virus.

5. La implementación del cribado de ARN-VHC con pruebas de amplificación genómica en *mini-pools* no ha alterado notablemente la forma de trabajo del Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana y no ha retrasado la liberación de las unidades de sangre. Por otra parte, los niveles de especificidad y sensibilidad alcanzados con esta técnica son superiores a los exigidos en la actualidad por las organizaciones internacionales.

6. El rendimiento observado con la introducción de las pruebas de detección genómica del VHC en la Comunitat Valenciana, entre 1999 y 2006 ha sido de una donación en periodo de ventana serológico por cada 320000 unidades de sangre. Este rendimiento es superior al obtenido en otros centros de transfusión españoles, europeos y de Estados Unidos, lo cual podría deberse a la prevalencia de infección por VHC más elevada en nuestra comunidad.

7. En el periodo 1999-2006 se han identificado 4 donaciones de sangre en periodo ventana serológico, lo que confirma la estimación del riesgo residual de transmisión de VHC a través de la transfusión de sangre en nuestra área y apoya la necesidad del cribado de las donaciones de sangre para la detección de ARN-VHC.

8. Con la introducción de las técnicas NAT en el cribado de donaciones de sangre para la detección de ARN-VHC se reduce el periodo ventana serológico a 12 días o menos, con lo que la totalidad de los casos de infección por VHC con ALT alterada son detectados por estas técnicas NAT. Ésto justifica la interrupción de las pruebas de cuantificación de ALT en el cribado de donaciones.

VII. RESUMEN

En el periodo 1991-2002 la prevalencia de infección por VHC en la población de donantes de sangre de la Comunitat Valenciana fue superior a la media de España y a la de otros países europeos y similar a la de Estados Unidos y Japón.

En cuanto a la tasa de incidencia de la infección por VHC en donantes de sangre, la Comunitat Valenciana presenta una tasa superior a la del resto de España y de los demás países considerados. Por tanto, el riesgo residual es también superior al de los demás países.

Entre las distintas provincias de la Comunitat Valenciana hay diferencias significativas entre los valores de prevalencia anual, siendo en el periodo 1991-1999 mayores en las provincias de Valencia y Castellón que en la provincia de Alicante ($p < 0.05$). En cambio, en el periodo 2000-2002 los valores de prevalencia de VHC en Alicante han sido similares a los de las provincias de Valencia y Castellón.

A lo largo del periodo 1990-2002, han ido disminuyendo los valores de prevalencia, incidencia y riesgo residual de transmisión de VHC. La disminución del riesgo residual se ha producido en parte por el aumento de sensibilidad en las pruebas de cribado. La exclusión de los donantes con riesgo de transmitir el VHC y la información recibida por la población general sobre las vías de contagio de la infección han contribuido, probablemente, al descenso de la prevalencia e incidencia.

La introducción de la pruebas NAT en 1999 para el cribado de todas las donaciones de sangre en la Comunitat Valenciana no ha supuesto grandes dificultades y ha reducido el periodo ventana de la infección por VHC y, por tanto, el riesgo residual, resultando un rendimiento esperado por la introducción de dichas pruebas NAT en el periodo 2000-2002 similar al rendimiento NAT observado.

La puesta en marcha de la prueba NAT en el cribado de donaciones de sangre, ha hecho que sea innecesaria la prueba de cuantificación de ALT para la detección de infección por VHC en las fases iniciales de la enfermedad.

La especificidad de las pruebas serológicas de cribado de 3ª generación para la detección de anticuerpos anti-VHC es mayor que la de las pruebas de 2ª generación ($p < 0.05$). Por último, la proporción de resultados indeterminados obtenidos con las pruebas de confirmación de 2ª y 3ª generación son similares.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Bihl F, Castelli D, Marincola F, Dodd RY, Brander C. Transfusion-transmitted infections. *J Transl Med* 2007; 5:25: 1-11.
<http://www.translational-medicine.com/content/5/1/25>
- (2) Busch MP, Alter HJ. Will human immunodeficiency virus p24 antigen screening increase the safety of the blood supply and, if so, at what cost? *Transfusion* 1995; 35(7):536-539.
- (3) Busch MP. [Residual risks of viral transmission by transfusions and projected yields of additional screening tests. *Retrovirus Epidemiology Donors Study (REDS)*]. *Transfus Clin Biol* 1996; 3(1):7-11.
- (4) Alvarez M. Interés de la epidemiología en medicina transfusional. Libro de comunicaciones: Ponencia T015: 89-98. X Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Madrid 1999.
- (5) Di Bisceglie AM. Hepatitis C. *Lancet* 1998; 351(9099):351-355.
- (6) Aguilera A, Romero S, Regueiro BJ. Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales. *Enferm Infeccc Microbiol Clin* 2006; 24 (4): 264-276
- (7) Alter HJ, Conry-Cantilena C, Melpolder J, Tan D, Van Raden M, Herion D, Lau D, Hoofnagle JH. Hepatitis C in asymptomatic blood donors. *Hepatology* 1997; 26(3 Suppl 1):29S-33S.
- (8) Orden 1685. DOGV nº 1330:5150-5151. (21/6/1990)
- (9) Busch MP. Transfusion-transmitted viral infections: building bridges to transfusion medicine to reduce risks and understand epidemiology and pathogenesis. *Transfusion* 2006; 46(9):1624-1640.
- (10) Aach RD, Stevens CE, Hollinger FB, Mosley JW, Peterson DA, Taylor PE, Johnson RG, Barbosa LH, Nemo GJ. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first- and second-generation assays *N Engl J Med* 1991; 325(19):1325-1329.
- (11) Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902):359-362.
- (12) Kuo G, Choo QL, Alter HJ, Gitnick GL, Redeker AG, Purcell RH, Miyamura T, Dienstag JL, Alter MJ, Stevens CE, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989; 244(4902):362-364.

- (13) Thomas R, Garner S, et al. Report on carcinogens background document for hepatitis C virus. Technology Planning and Management Corporation for U.S Department of Health and Human Services. Public Health Service. National Toxicology Program. Research Triangle Park, NC 27709, 2003 Jun:1-188. Informe número:N-01-ES-85421. Disponible en UTR:
http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/newhomeroc/roc11/HCV_RG2Public.pdf
- (14) Esteban JI, Camps J, Genesca J, Alter HJ. Hepatitis C and B: New developments. Blood Safety: Current Challenges. Bethesda, MD American Association Blood Banks; 1992. p. 45-67.
- (15) Echeverria JM, Leon P Pozo F, Avellón A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enferm Enfec Microbiol Clin* 2006; 24 (1):20-25.
- (16) WHO. Global surveillance and control of hepatitis C. report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J Viral Hepat* 1999; 6:35-47.
- (17) Bruguera M, Forn X. Hepatitis C en España. *Med Clin (Barc)* 2006; 127: 113-117.
- (18) Weigand K, Stremmel W, Encke J. Treatment of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007; 13(13): 1897-1905. Disponible en UTR:
<http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/1897.asp>
- (19) Allain JP. The status of hepatitis C virus screening. *Transfus Med Rev* 1998; 12(1):46-55.
- (20) Gretch DR. Diagnostic test for hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26:3 Suppl. 1: 43-47.
- (21) Aoyagi K, Ohue C, Iida K, Kimura T, Tanaka E, Kiyosawa K, Yagi S. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6):1802-1808.
- (22) Busch, M.P.; Stramer, S.L.; Kleinman, S. Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. *American Association of Blood Banks* 1997: 123-146.

- (23) Myers TW, Gelfand DH. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1991; 30(31):7661-7666.
- (24) Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)* 1993; 11(9):1026-1030.
- (25) Costa J. Real-time PCR. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(5):299-304.
- (26) Gretch DR, Wilson JJ, Carithers RL Jr, De la Rosa C, Han JH, Corey L. Detection of hepatitis C virus RNA: comparison of one-stage polymerase chain reaction (PCR) with nested-set PCR. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(2):289-291.
- (27) Kacian DL, Fultz TJ, inventores; Gen-Probe Incorporated, cesionario. Nucleic Acid sequence amplification methods. US Patent 5,399,491. 1995 Mar 21
- (28) Kievits T, van Gemen B, van Strijp D, Schukking R, Dircks M, Adriaanse H, Malek L, Sooknanan R, Lens P. NASBA isothermal enzymatic in vitro nucleic acid amplification optimized for the diagnosis of HIV-1 infection. *J Virol Methods* 1991; 35(3):273-286.
- (29) León P, López JA, de Ory F, Elola C, Echeverría JM. Detección de anticuerpos IgG de baja avididad en el diagnóstico de la infección primaria aguda por virus de la hepatitis C. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1997; 15:14-18.
- (30) Kanno A, Kazuyama Y. Immunoglobulin G antibody avidity assay for serodiagnosis of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 2002; 68:229-233.
- (31) Real Decreto 1088/2005. BOE 2005; 225:31288-31304. (Sep.20, 2005).
- (32) Resolución WHA 28.72 de la OMS, 1975.
- (33) Guía sobre la transfusión de componentes sanguíneos y derivados plasmáticos. SETS 2003 2ª edición. Disponible en UTR: http://www.sets.es/sets/web/documentos/1/documento_2574.pdf
- (34) No authors. Paid vs. unpaid donors. *Vox Sang.* 2006; 90(1):63-70.

- (35) Muñoz M, Salas J, GarcíaVallejo JJ. Autotransfusión en Urgencias. 2002; 1-32. Disponible en UTR: [http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/manual de urgencias emergencias/autotran.pdf](http://www.medynet.com/usuarios/jraguilar/manual%20de%20urgencias%20emergencias/autotran.pdf)
- (36) Blajchman MA. Immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions: clinical manifestations and mechanisms. *Vox Sang* 1998; 74 Suppl 2:315-319.
- (37) Esteban JI, Esteban R, Viladomiu L, Lopez-Talavera JC, Gonzalez A, Hernandez JM, Roget M, Vargas V, Genesca J, Buti M, et al. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2(8658):294-297.
- (38) Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G. Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N Engl J Med* 1989; 321(22):1494-1500.
- (39) Stevens CE, Taylor PE, Pindyck J, Choo QL, Bradley DW, Kuo G, Houghton M. Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study in volunteer blood donors. *JAMA* 1990; 263(1):49-53.
- (40) Kleinman S, Busch MP, Korelitz JJ, Schreiber GB. The incidence/window period model and its use to assess the risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfus Med Rev* 1997; 11(3):155-172.
- (41) Ikeda Y, Toda G, Hashimoto N, Kurokawa K. Antibody to superoxide dismutase, autoimmune hepatitis, and antibody tests for hepatitis C virus. *Lancet* 1990; 335(8701):1345-1346.
- (42) Theilmann L, Blazek M, Goeser T, Gmelin K, Kommerell B, Fiehn W. False-positive anti-HCV tests in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1990; 335(8701):1346.
- (43) Goeser T, Blazek M, Gmelin K, Kommerell B, Theilmann L. Washing with 8 mol/l urea to correct false-positive anti-HCV results. *Lancet* 1990; 336(8719):878.

- (44) Allain JP, Coghlan PJ, Kenrick KG, Whitson K, Keller A, Cooper GJ, Vallari DS, Delaney SR, Kuhns MC. Prediction of hepatitis C virus infectivity in seropositive Australian blood donors by supplemental immunoassays and detection of viral RNA. *Blood* 1991; 78(9):2462-2468.
- (45) Aoki SK, Holland PV, Fernando LP, Kuramoto IK, Anderson S, Sazama K, Schoening V, Johnson P, Wilber JC, Fenner L, et al. Evidence of hepatitis in patients receiving transfusions of blood components containing antibody to hepatitis C. *Blood* 1993; 82(3):1000-1005.
- (46) Menitove JE, Richards WA, Destree M. Early US experience with anti-HCV kit in blood donors. *Lancet* 1990; 336(8709):244-245.
- (47) Hosein B, Fang CT, Popovsky MA, Ye J, Zhang M, Wang CY. Improved serodiagnosis of hepatitis C virus infection with synthetic peptide antigen from capsid protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(9):3647-3651.
- (48) Van der Poel CL, Bresters D, Reesink HW, Plaisier AA, Schaasberg W, Leentvaar-Kuypers A, Choo QL, Quan S, Polito A, Houghton M, et al. Early antihepatitis C virus response with second-generation C200/C22 ELISA. *Vox Sang* 1992; 62(4):208-212.
- (49) Gutiérrez A, Campos A, Álvarez M, Rodrigo C, Tascón A. El virus de la hepatitis C, cinco años después de su descubrimiento (y III). *Inmunología* 1995; (4): 180-186.
- (50) Leon P, Lopez JA, Domingo C, Echevarria JM. Evaluation of laboratory assays for screening antibody to hepatitis C virus. *Transfusion*. 1993; 33(3):268-270.
- (51) Dow BC, Follett EA, Jordan T, McOmish F, Davidson J, Gillon J, Yap PL, Simmonds P. Testing of blood donations for hepatitis C virus. *Lancet* 1994; 343(8895):477-478.
- (52) Vernelen K, Claeys H, Verhaert H, Volckaerts A, Vermynen C. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. *Lancet* 1994; 343(8895):477-478.
- (53) Uyttendaele S, Claeys H, Mertens W, Verhaert H, Vermynen C. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. *Vox Sang* 1994; 66(2):122-129.

- (54) León P, López JA, Elola C, Domingo CJ, Echevarría JM. Detection of antibody to hepatitis C virus E2 recombinant antigen among samples indeterminate for anti-HCV after wide serological testing and correlation with viremia. *Vox sang* 1996; 70:213-216.
- (55) León P, López JA, Elola C, Lee SR, Calmann, Echeverría JM. Use of overlapping synthetic peptides to characterise samples from blood donors with indeterminate results to hepatitis C virus core antigen. *Vox Sang* 1998; 75:32-36.
- (56) Hernández JM, Alvarez M, Eiras A, Fernández Montoya A, Franco E, García Villaescusa R, Ibarra A, Maymó R, Oyonarte S, Sedeño M, Tascón A, Vesga MA. Estudio multicéntrico de evaluación de una prueba de detección de antígeno del virus de la hepatitis C. XI Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Bilbao 2000.
- (57) Lee SR, Peterson J, Niven P, Bahl C, Page E, DeLeys R, Giordano-Schmidt D, Baggett D, Green G. Efficacy of a hepatitis C virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of 'window-phase' blood donations. *Vox Sang* 2001; 80(1):19-23
- (58) Grant PR, Sims CM, Tedder RS. Quantification of HCV RNA levels and detection of core antigen in donations before seroconversion. *Transfusion*. 2002 Aug; 42(8):1032-1036.
- (59) Alvarez 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(4):266-267.
- (60) Laperche S, Le Marrec N, Simon N, Bouchardeau F, Defer C, Maniez-Montreuil M, Levayer T, Zappitelli JP, Lefrere JJ. A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection. *Transfusion* 2003; 43(7):958-962.
- (61) Busch MP, Korelitz JJ, Kleinman SH, Lee SR, AuBuchon JP, Schreiber GB. Declining value of alanine aminotransferase in screening of blood donors to prevent posttransfusion hepatitis B and C virus infection. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *Transfusion* 1995; 35(11):903-910.

- (62) Jackson BR, Busch MP, Stramer SL, AuBuchon JP. The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations. *Transfusion* 2003; 43(6):721-729.
- (63) Brinkmann T, Dreier J, Diekmann J, Gotting C, Klauke R, Schumann G, Kleesiek K. Alanine aminotransferase cut-off values for blood donor screening using the new International Federation of Clinical Chemistry reference method at 37 degrees C. *Vox Sang* 2003; 85(3):159-164.
- (64) Lozano M, Cid J, Bedini JL, Mazzara R, Gimenez N, Mas E, Ballesta A, Ordinas A. Study of serum alanine-aminotransferase levels in blood donors in Spain. *Haematologica* 1998; 83(3):237-239.
- (65) Packett Insert Analizador ALCYON 300/300i: Prospecto del reactivo para la alanina aminotransferasa.
- (66) Human plasma for fractionation. *European Pharmacopoeia* 4.5 2002:3715-3716.
- (67) Plasma-derived Medicinal Products: position paper on ALT testing. CPMP/BWP/269/95 rev.3. EMEA 2001.
- (68) Glynn SA, Wright DJ, Kleinman SH, Hirschorn D, Tu Y, Heldebrant C, Smith R, Giachetti C, Gallarda J, Busch MP. Dynamics of viremia in early hepatitis C virus infection. *Transfusion* 2005; 45(6):994-1002.
- (69) Busch MP, Glynn SA, Stramer SL, Strong DM, Caglioti S, Wright DJ, Pappalardo B, Kleinman SH; NHLBI-REDS NAT Study Group. A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion* 2005; 45(2):254-264.
- (70) 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(26):1685-1690.
- (71) Courouce AM, Pillonel J. Estimation of risk of virus transmission in hepatitis B and C and human retrovirus via transfusion of labile blood derivatives. *Transfus Clin Biol* 1996; 3(1):13-28.
- (72) Glynn SA, Kleinman SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the incidence rate/window period model. *Transfusion* 2002; 42(8):966-972.

- (73) Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW, Weiner AJ, Quan S, Di Nello R, VanBoven JJ, Winkel I, Mulder-Folkerts D, Exel-Oehlers PJ, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337(8737):317-319.
- (74) Busch MP, Tobler L, Quan S, Wilber JC, Johnson P, Polito A, Steane E, Zola A, Bahl C, Nelles M, et al. A pattern of 5-1-1 and c100-3 only on hepatitis C virus (HCV) recombinant immunoblot assay does not reflect HCV infection in blood donors. *Transfusion* 1993; 33(1):84-88.
- (75) Evans CS, Tobler L, Polito A, Stewart J, Chien D, Wilber J, Quan S, Delaney S, Kuo G, Busch MP. Comparative evaluation of supplemental hepatitis C virus antibody test systems. *Transfusion* 1992; 32(5):408-414.
- (76) Van der Poel CL, Reesink HW, Mauser-Bunschoten EP, Kaufmann RH, Leentvaar-Kuypers A, Chamuleau RA, Schaasberg W, Bakker E, Exel-Oehlers PJ, Theobalds I, et al. Prevalence of anti-HCV antibodies confirmed by recombinant immunoblot indifferent population subsets in The Netherlands. *Vox Sang* 1991; 61(1):30-36.
- (77) Allain JP, Rankin A, Kuhns MC, McNamara A. Clinical importance of HCV confirmatory testing in blood donors. *Lancet*. 1992 May 9; 339(8802):1171-1172.
- (78) Tobler LH, Busch MP, Wilber J, Dinello R, Quan S, Polito A, Kochesky R, Bahl C, Nelles M, Lee SR. Evaluation of indeterminate c22-3 reactivity in volunteer blood donors. *Transfusion*. 1994; 34(2):130-134.
- (79) Damen M, Zaaier HL, Cuypers HT, Vrieling H, van der Poel CL, Reesink HW, Lelie PN. Reliability of the third-generation recombinant immunoblot assay for hepatitis C virus. *Transfusion* 1995; 35(9):745-749.
- (80) Bresters D, Zaaier HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, van Exel-Oehlers PJ, van Drimmelen AA, Jansen PL, van der Poel CL, Lelie PN. Recombinant immunoblot assay reaction patterns and hepatitis C virus RNA in blood donors and non-A, non-B hepatitis patients. *Transfusion* 1993; 33(8):634-638.
- (81) Leon P, Lopez JA, Domingo CJ, Elola C, Echevarria JM. Serological studies and hepatitis C virus RNA in serum samples from blood donors with indeterminate results in second-generation recombinant immunoblot assay. *Vox Sang* 1994; 66(3):245-246.

- (82) Dow BC, Follett EA, Munro H, Buchanan I, Roy K, McOmish F, Yap PL, Simmonds P. Failure of 2nd- and 3rd-generation HCV ELISA and RIBA to detect HCV polymerase chain reaction-positive donations. *Vox Sang* 1994; 67(2):236-237.
- (83) Yuki N, Hayashi N, Hagiwara H, Naito M, Ohkawa K, Kasahara A, Fusamoto H, Ohtani S, Okubo Y, Kamada T. Hepatitis C virus antibodies and virus replication in asymptomatic blood donors. *Vox Sang* 1994; 67(3):280-285.
- (84) Vila E, Planelles D, Villalba JV, Rodríguez M, Terrazas O, Roig R, Montoro JA. Análisis de una donación de sangre RIBA indeterminado, PCR ARN-VHC positivo. XV Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Valencia 2004.
- (85) Allain JP. Can the recombinant immunoblot assay generate an erroneous diagnosis of hepatitis C virus infection? *Transfusion*. 1996 May; 36(5):476-477.
- (86) Coste J, Reesink HW, Engelfriet CP, Laperche S, Brown S, Busch MP, Cuijpers HT, Elgin R, Ekermo B, Epstein JS, Flesland O, Heier HE, Henn G, Hernandez JM, Hewlett IK, Hyland C, Keller AJ, Krusius T, Levicnik-Stežina S, Levy G, Lin CK, Margaritis AR, Muylle L, Niederhauser C, Pastila S, Pillonel J, Pineau J, van der Poel CL, Politis C, Roth WK, Sauleda S, Seed CR, Sondag-Thull D, Stramer SL, Strong M, Vamvakas EC, Velati C, Vesga MA, Zanetti A. Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003. *Vox Sang* 2005 May; 88(4):289-303.
- (87) Busch MP, Dodd RY. NAT and blood safety: what is the paradigm? . *Transfusion* 2000; 40(10):1157-1160.
- (88) Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990; 93(1):125-128.
- (89) Hu DJ, Dondero TJ, Rayfield MA, George JR, Schochetman G, Jaffe HW, Luo CC, Kalish ML, Weniger BG, Pau CP, Schable CA, Curran JW. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* 1996; 275(3):210-216.

- (90) Soni P, Dusheico GM, Dhillon AP, Harrison TJ. Genetic diversity of hepatitis C virus: Implications for pathogenesis, treatment, and prevention. *Lancet* 1995; 345:562-566
- (91) Packett Insert Cobas Ampliscreen HCV Test. 2002. Roche Diagnostics, versión 2.0.
- (92) Packett Insert Procleix Ultrio Tigris Assay. 2004. Gen Probe/Chiron.
- (93) Packett Insert Cobas Taqscreen MPX Test for use on the Cobas s201 system. 2005. Roche Diagnostics.
- (94) Eiras A, Sauleda S, Planelles D, Sedeno M, Ibarra A, Vesga MA, Franco E, Montoro JA, Hernandez JM, Villaescusa RG. HCV screening in blood donations using RT-PCR in mini-pool: the experience in Spain after routine use for 2 years. *Transfusion* 2003; 43(6):713-720.
- (95) Tabor E, Epstein JS. NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy. *Transfusion* 2002; 42(9):1230-1237.
- (96) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.
- (97) Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G. DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988; 239(4837):295-297.
- (98) Zaaijer HL, Cuypers HT, Reesink HW, Winkel IN, Gerken G, Lelie PN. Reliability of polymerase chain reaction for detection of hepatitis C virus. *Lancet* 1993; 341(8847):722-724.
- (99) Planelles D. ABC de las técnicas de biología molecular. *Sangre* 1998; 43 (1) :8-12
- (100) McDonough SH, Giachetti C, Yang Y, Kolk DP, Billyard E, Mimms L. High Throughput Assay for the simultaneous or separate detection of human immunodeficiency virus (HIV) and Hepatitis Type C virus (HCV). *Infusionsther Transfusionsmed* 1998; 25: 164-169
- (101) Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3):495-503.

- (102) Beld M, Habibuw MR, Rebers SP, Boom R, Reesink HW. Evaluation of automated RNA-extraction technology and a qualitative HCV assay for sensitivity and detection of HCV RNA in pool-screening systems. *Transfusion* 2000; 40(5):575-579.
- (103) QIAMP 96 virus Biorobot kit Handbook 06/2000. Qiagen.
- (104) Grant PR, Sims CM, Krieg-Schneider F, Love EM, Eglin R, Tedder RS. Automated screening of blood donations for hepatitis C virus RNA using the Qiagen BioRobot 9604 and the Roche COBAS HCV Amplicor assay. *Vox Sang* 2002; 82(4):169-176.
- (105) Vila E, Planelles D, Suñer L, Rodríguez M, Gómez I, Jarque D, Montoro JA, Franco E. Evaluación del BIOROBOT 9604 de QIAGEN para la extracción automática de ARN del VHC y VIH en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Barcelona 2002.
- (106) Barany F. Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(1):189-193.
- (107) Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP. Strand displacement amplification, an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res* 1992; 20(7):1691-1696.
- (108) Arnold LJ Jr, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem.* 1989; 35(8):1588-1594
- (109) Petrik J. Microarray technology: the future of blood testing?. *Vox Sang* 2001; 80(1):1-11.
- (110) Busch MP, Wright DJ, Custer B, Tobler LH, Stramer SL, Kleinman SH, Prince HE, Bianco C, Foster G, Petersen LR, Nemo G, Glynn SA. West Nile virus infections projected from blood donor screening data, United States, 2003. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(3):395-402.
- (111) Alvarez M. Nuevas tecnologías en determinaciones de ácidos nucleicos NAT. SETS, vol 18-supl. nº 1: 89-92.

- (112) Lelie PN, van Drimmelen HA, Cuypers HT, Best SJ, Stramer SL, Hyland C, Allain JP, Moncharmont P, Defer C, Nubling M, Glauser A, da Silva Cardoso M, Viret JF, Lankinen MH, Grillner L, Wirthmuller U, Coste J, Schottstedt V, Masecar B, Dax EM. Sensitivity of HCV RNA and HIV RNA blood screening assays. *Transfusion* 2002;42(5):527-536.
- (113) Koppelman MH, Assal A, Chudy M, Torres P, de Villaescusa RG, Reesink HW, Lelie PN, Cuypers HT. Multicenter performance evaluation of a transcription-mediated amplification assay for screening of human immunodeficiency virus-1 RNA, hepatitis C virus RNA, and hepatitis B virus DNA in blood donations. *Transfusion* 2005; 45(8):1258-1266.
- (114) Vila E, Planelles D, Rodríguez M, Montoro JA. Evaluation of nucleic acid amplification technologies (NAT) for sensitivity and detection of RNA-HIV in human plasma from a Spanish blood centre. XXVth International Congress of the World Federation of Hemophilia. *Haemophilia* 2002; 8: 535
- (115) Montoro JA., Villalba JV, Planelles D, Ramada C, Puig N, Vila E, Franco E. Evaluation of a simultaneous nucleic acid testing: TMA versus PCR for HCV and HIV-1 testing in a Spanish blood Center. VII European Congress of the International Society of Blood Transfusion. *Transfusion Clinique et Biologique* 2001; 8: 92s.
- (116) Becker JB, Jarvis LM, Cleland S, Queiros L, Aquiar A, Azevedo J, Aprili G, Bressan F, Torres P, Nieto S, A Urssiti A, Montoro JA, Vila E, Ramada C, Mathiessen P. Multi-Centre evaluation of Roche Cobas S 201 System: An automated platform for NAT blood screening. XVII Regional Congress of the ISBT, Europe. *Vox sanguinis* 2007; 93 (suppl.1): 154
- (117) Vila E, Alvarez M, Villalba J, Ramada C, Llagunes I, Planelles D, Puig N, Montoro JA, Roig. Sensitivity analysis of the Procleix Ultrio-Tigris System for nucleic acid testing in a Spanish Transfusion Center. XVII Regional Congress of the ISBT, Europe. Madrid 2007. *Vox sanguinis* 2007, 93 (suppl.1): 161.

- (118) Busch MP, Glynn SA, Wright DJ, Hirschhorn D, Laycock ME, McAuley J, Tu Y, Giachetti C, Gallarda J, Heitman J, Kleinman SH; National Heart, Lung, Blood Institute Nucleic Acid Test Study Group. Relative sensitivities of licensed nucleic acid amplification tests for detection of viremia in early human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection. *Transfusion* 2005; 45(12):1853-1863.
- (119) Vila E., Planelles D, Atienza T, Granell R, Jarque D, Montoro JA. Niveles de viremia de VHC en donantes de sangre anti-VHC (+), ARN-VHC (+): consideraciones sobre el cribado por PCR en “pool” de donaciones. X Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Madrid 1999.
- (120) Vila E, Planelles D, Rodríguez M, Villalba JV, Montoro JA, E. FRANCO. Detección por PCR del ADN-VHB en plasma humano de donaciones de sangre HbsAg positivas: consideraciones sobre el screening en *pools* de donaciones. XIV Congreso de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Granada 2003
- (121) Vila E, Villalba JV, Ramada C, Ruiz E, Sarrión M, Navarro R, Planelles D, Puig N, Montoro JA, Roig R. Implementation of Procleix Tigris System for Nucleic Acid Testing of the blood donations in a Transfusion Center. XVII Regional Congress of the ISBT, Europe. *Vox sanguinis* 2007; 93 (suppl.1): 161-162.
- (122) Vila E, Villalba JV, Ramada C, Planelles D, Puig N, Montoro JA, Roig R. Evaluación del sistema Cobas S201 Taqscreen MPX para la detección del ARN-VHC, ARN-VIH1, ARN-VIH2 y ADN-VHB en el cribado de unidades de sangre. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Palma de Mallorca 2006.
- (123) Busch MP. HIV, HBV and HCV: new developments related to transfusion safety. *Vox Sang* 2000; 78 Suppl 2:253-256.
- (124) Hernandez JM. Revisión de los métodos de segurización del PFC: Seis años después del decreto. *SETS* 2006; 18-supl.1:96-98.
- (125) Castrillo A. Fundamentos y utilidad de los métodos de inactivación de patógenos. *SETS* 2006; 18, spl. 1: 19-24.

- (126) Comisión científica de la Real Fundación Victoria Eugenia. Recomendaciones para la selección y uso de productos terapéuticos para el tratamiento de la hemofilia y otras coagulopatías congénitas. Dirección UTR:
<http://www.hemofilia.com//fotos/964dtmy8f7w.pdf>
- (127) Foster PR, Welch AG, McLean C, Griffin BD, Hardy JC, Bartley A, MacDonald S, Bailey AC. Studies on the removal of abnormal prion protein by processes used in the manufacture of human plasma products. *Vox Sang* 2000; 78(2):86-95
- (128) Foster PR, Griffin BD, Bienek C, McIntosh RV, MacGregor IR, Somerville RA, Steele PJ, Reichl HE. Distribution of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent over ion-exchange chromatography used in the preparation of concentrates of fibrinogen and factor VIII. *Vox Sang* 2004 F; 86(2):92-99.
- (129) Lackritz EM, Satten GA, Aberle-Grasse J, Dodd RY, Raimondi VP, Janssen RS, Lewis WF, Notari EP 4th, Petersen LR. Estimated risk of transmission of the human immunodeficiency virus by screened blood in the United States. *N Engl J Med*. 1995; 333(26):1721-1725.
- (130) Busch MP. Retroviruses and Blood Transfusions: The Lessons Learned and Challenge Yet Ahead. In: Nance SJ, (ed): Blood safety: current challenges. Bethesda, MD, American Association of Blood Banks, 1992, pp 1-44.
- (131) Schuartz DWM; Simson G; et al. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV-negative blood components in Germany and Austria. *Ann. Hematol* 1995; 70(4):209-213
- (132) Alvarez-Dardet C, Bolúmar F, Porta Serra M. La medición de la frecuencia de la enfermedad. *Med Clin (Barc)* 1987; 88: 287-291
- (133) Ahlbom A, Novell S. Fundamentos de epidemiología. Madrid: Siglo XXI de España editores SA, 1987.
- (134) Nelson KE, Donahue JG, Munoz A, Cohen ND, Ness PM, Teague A, Stambolis VA, Yawn DH, Callicott B, McAllister H, et al. Transmission of retroviruses from seronegative donors by transfusion during cardiac surgery. A multicenter study of HIV-1 and HTLV-I/II infections. *Ann Intern Med* 1992; 117(7):554-559.

- (135) Kleinman S, Secord K. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV negative blood. Estimates using the lookback methodology. *Transfusion* 1988; 28(5):499-501.
- (136) Conley LJ, Holmberg SD. Transmission of AIDS from blood screened negative for antibody to the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med*. 1992; 326(22):1499-1500.
- (137) Ward JW, Holmberg SD, Allen JR, Cohn DL, Critchley SE, Kleinman SH, Lenes BA, Ravenholt O, Davis JR, Quinn MG, et al. Transmission of human immunodeficiency virus (HIV) by blood transfusions screened as negative for HIV antibody. *N Engl J Med* 1988; 318(8):473-478.
- (138) Kleinman SH, Busch MP. The risks of transfusion-transmitted infection: direct estimation and mathematical modelling. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 2000; 13(4):631-649.
- (139) Koerner K, Cardoso M, Dengler T, Kerowgan M, Kubanek B. Estimated risk of transmission of hepatitis C virus by blood transfusion. *Vox Sang* 1998; 74(4):213-216.
- (140) Alvarez M, Oyonarte S, Rodriguez PM, Hernandez JM. Estimated risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain. *Transfusion* 2002; 42(8):994-998.
- (141) Soldan K, Barbara JA, Heptonstall J. Incidence of seroconversion to positivity for hepatitis C antibody in repeat blood donors in England, 1993-5. *BMJ* 1998; 316(7142):1413-1417.
- (142) Korelitz JJ, Busch MP, Kleinman SH, Williams AE, Gilcher RO, Ownby HE, Schreiber GB. A method for estimating hepatitis B virus incidence rates in volunteer blood donors. *Transfusion* 1997; 37(6):634-640.
- (143) Cumming PD, Wallace EL, Schorr JB, Dodd RY. Exposure of patients to human immunodeficiency virus through the transfusion of blood components that test antibody-negative. *N Engl J Med* 1989; 321(14):941-946.
- (144) Riggert J, Schwartz DW, Uy A, Simson G, Jelinek F, Fabritz H, Mayr WR, Kohler M. Risk of hepatitis C virus (HCV) transmission by anti-HCV-negative blood components in Austria and Germany. *Ann Hematol* 1996; 72(1):35-39.

- (145) Courouce AM. HIV seropositivity in blood donors from 1990 to 1992: prevalence, estimation of residual risk of transfusion-related infections and epidemiology. *Rev Fr Transfus Hemobio* 1993; 36(4):327-337.
- (146) Muller-Breitkreutz K. Results of viral marker screening of unpaid blood donations and probability of window period donations in 1997. EPFA Working Group on Quality Assurance. *Vox Sang* 2000; 78(3):149-157.
- (147) Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first International Standard for nucleic acid technology (NAT) assay for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang* 1999; 76: 149-158.
- (148) Vila E, Planelles D, Álvarez M, Montoro JA. Routine HCV-PCR screening of blood donations: experience in Valencian Community after 28 months and comparison with serologic HCV test. XXVth International Congress of the World Federation of Hemophilia 2002. *Haemophilia* 2002; 8:532.
- (149) Vila E., Planelles D, Alvarez M, Villalba JV, Suñer L, M. Rodriguez M, Montoro JA, Franco E. Análisis de dos donaciones de sangre ARN-VHC(+) en periodo ventana serológico detectadas mediante screening por PCR en el Centro de Transfusión de la Comunitat Valenciana. XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Barcelona 2002
- (150) Vila E, Alvarez M, Villalba JV, Parada C, Planelles D, Puig N, Montoro JA, Tascón A. Detección mediante cribado por PCR de dos nuevas donaciones de sangre ARN-VHC (+) en periodo ventana serológico. XVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Transfusión Sanguínea. Palma de Mallorca 2006.
- (151) Lilienfeld AM, Lilienfeld DE. *Fundamentos de Epidemiología*. México: Fondo Educativo Interamericano 1983; 303.
- (152) Lelie PN, Van Drimmelen HA, Cuypers HT, et al. Sensitivity of HCV RNA an HIV RNA blood screening assays. *Transfusion* 2002; 42: 527-536.
- (153) Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusión-transmitted infections disease. Report of interorganizational task force on nucleic acid amplification testing of blood donors. *Transfusion* 2000; 40: 143-159.

- (154) Busch MP, Watanabe KK, Smith JW, Hermansen SW, Thomson RA and for the Retrovirus Epidemiology Donor Study. False-negative testing errors in routine viral marker screening of blood donors. *Transfusion* 2000; 40: 585-589.
- (155) Wang B, Schreiber GB, Glynn SA, Kleinman S, Wright DJ, Murphy EL, Busch MP. Does prevalence of transfusion-transmissible viral infection reflect corresponding incidence in United States blood donors? *Transfusion* 2005; 45:1089-1096
- (156) 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(8):975-979.
- (157) Sy T, Jamal MM. Epidemiology of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 2006; 3(2):41-46.
- (158) Informes vigilancia de las enfermedades de declaración obligatoria (EDO) en la Comunidad Valenciana 2003. Dirección UTR: http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/enf_hepatitis_viricas_2003.pdf
- (159) Resumen de la vigilancia de las enfermedades de declaración obligatoria (EDO) en la Comunidad Valenciana 2004. Dirección UTR: http://biblioteca.sp.san.gva.es/biblioteca/publicaciones/MATERIAL/PUBLICACIONES/EPI/VIG_EI/IS_80.PDF
- (160) Chimeno MM, Chacarro A, Brezmes P, Ochoa JP. Seroprevalencia del virus de la hepatitis C en población general. *Enf Inf Microbiol Clin* 2002; 20:64-67.
- (161) López-Izquierdo R, Udaondo MA, Zarzosa P, García-Ramón E, Garcinuño S, Bratos MA, Orduña A, Rodríguez-Torres A, Almaraz A. Seroprevalencia de las hepatitis virales en población general representativa de una zona básica de salud urbana en Castilla y León. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(5):317-323.
- (162) Riestra S, Fernandez E, Leiva P, García S, Ocio G, Rodrigo L. Prevalence of hepatitis C virus infection in the general population of northern Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13:477-481.

- (163) Suarez A, Viejo G, Navascues CA, García R, Díaz G, Saro C, et al. Prevalencia de marcadores frente a los virus A, B y C de la hepatitis en la población de Gijón entre 26 y 65 años de edad. *Gastroenterol Hepatol* 1997; 20:347-352.
- (164) Sola R, Cruz De Castro E, Hombrados M, Planas R, Coll S, Jordi R, et al. Prevalencia de las hepatitis B y C en diversas comarcas de Cataluña: estudio transversal. *Med Clin (Barc)* 2002; 119(3):90-95.
- (165) Dominguez A, Bruguera M, Vidal J, Plans P, Salleras L. Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol* 2001; 65: 688-693.
- (166) Sacristán B, Gastañares MI, Elena A, Sacristán M, Barcenilla J, García JC, et al. Infección por el virus de la hepatitis C. Estudio socioepidemiológico en población general de La Rioja. *Med Clin (Barc)* 1996; 107:331-335.
- (167) Alvarez do Barrio M, Gonzalez Diez R, Hernandez Sanchez JM, Oyonarte Gomez S. Residual risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, 1997-2002, *Euro Surveill* 2005; 10(2):20-22.
- (168) Pillonel J, Laperche S, Saura C, Desenclos JC, Couroucé AM. Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2000. *Transfusion* 2002; 42(8):980-988.
- (169) Velati C, Romano L, Baruffi L, Pappalettera M, Carrera V, Zanetti AR. Residual Risk of transfusión-transmitted HCV and HIV infections by antibody-sceened blood in Italy. *Transfusion* 2002; 42: 989-993
- (170) Velati C, Fomiatti L, Baruffi L, Romano L, Zanetti A. Impact of nucleic acid amplification technology (NAT) in Italy in the three years following implementation (2001-2003). *Euro Surveill* 2005; 10(2):12-14.