

## **Evaluación de las técnicas de amplificación genómica (NAT) para el tamizaje de hepatitis B en donantes de sangre. Revisión sistemática.**

*Jesús Ruiz-Aragón y Sergio Márquez-Peláez.*

Agencia de Evaluación de Tecnología Sanitaria de Andalucía (AETSA),  
Consejería de Salud, Junta de Andalucía. Sevilla, España.

**Palabras clave:** Hepatitis B, técnicas de amplificación genómica; tamizaje.

**Resumen.** Las nuevas técnicas de biología molecular, denominadas técnicas de amplificación del ADN genómico “*nucleic acid testing*” (NAT), permiten la detección de partículas del ADN viral de la hepatitis B, independientemente de la fase de la enfermedad. Estas técnicas aumentan la sensibilidad del tamizaje, así el riesgo de infección mediante transfusiones podría reducirse. Se han evaluado las técnicas NAT para el tamizaje de hepatitis B en donantes de sangre. Se ha realizado una revisión sistemática en las bases Medline y Embase (2000-2008), así como en INAHTA, Cochrane Library y Euroscan con términos MeSH “*Hepatitis B*”, “*Blood Transfusion*”, “*Blood Donors*”, y “*Nucleic Acid Amplification Techniques*”, y la terminología libre “*hepatitis b*”, “*hbv*”, “*nat*”, “*nat-hbv*” y “*nucleic acid amplification testing*”. Se incluyeron doce estudios, cuatro de ellos utilizaron PCR de fabricación propia, obteniendo resultados dispares; tres emplearon Procleix® (dos determinaron muestras mediante NAT que fueron HBsAg (-), 0,05% y 0,013% y el tercero, con 135 pacientes con terapia anti-VHB y HBsAg (-), obtuvo un 80% de muestras positivas mediante técnicas NAT). Cuatro trabajos con MPX® registraron porcentajes comprendidos entre 0,083 y 0,0015. En el estudio de pruebas diagnósticas incluido, las dos técnicas resultaron tener la misma sensibilidad. Por ello, se puede afirmar que las dos técnicas NAT poseen buena capacidad de tamizaje de hepatitis B, ofreciendo resultados en sensibilidad similares y podrían constituir un avance significativo en la automatización de los bancos de sangre y aumentar la seguridad de los pacientes que reciben transfusiones.

## **Assessment of nucleic acid testing (NAT) for screening hepatitis B in blood donors. Systematic review.**

*Invest Clin 2010; 51(3): 341 - 349*

**Key words:** Hepatitis B; nucleic acid testing; screening.

**Abstract.** The new techniques of molecular biology called “nucleic acid testing” (NAT), enable the detection of particles of viral DNA in hepatitis B, regardless of the disease stage. These NAT techniques increase the sensitivity of screening, so the risk of infection through transfusion could be reduced. The aim of the study was to assess NAT techniques for screening hepatitis B in blood donors. We carried out a systematic review in Medline and Embase databases (2000-2008), as well as INAHTA, Cochrane Library and EuroScan. MeSH terms used were “Hepatitis B”, “Blood Transfusion”, “Blood Donors”, and “Nucleic Acid Amplification Techniques”, and free terms as “hepatitis B”, “hbc”, “nat”, “nat-hbc” and “nucleic acid amplification testing”. Twelve studies were included, four of them used self-made PCRs, obtaining mixed results, three used Procleix® (two samples identified by NAT were HBsAg (-), 0.05% and 0.013%; and the third study with 135 patients who received anti-HBV therapy and had HBsAg (-), showed 80% of positive samples by NAT techniques). Four papers about MPX® reported percentages ranging between 0.083 and 0.0015. In the study of diagnostic tests including the two techniques, they showed the same sensitivity. Both NAT techniques, have a good capacity for screening hepatitis B and showed similar results in sensitivity. They may be a significant advance in automation of blood banks and increase the safety of transfused patients.

*Recibido: 27-10-2009. Aceptado: 16-04-2010.*

### **INTRODUCCIÓN**

La transfusión sanguínea constituye unas de las muchas rutas de transmisión del virus de la hepatitis B (VHB). La infección se ha incrementado durante las últimas décadas y es endémica en muchos países. La prevalencia a nivel mundial, según estudios analizados, de la presencia de antígeno de superficie (HBsAg) en sangre de donantes es del 0,41%, con cifras que oscilan entre 3,64% en países del Este de Europa como Albania o Rumania, del 8 al 20% en el Sudeste asiático, China ó África tropical, o del 0,35% en Italia (1). La prevalencia de hepatitis B en Venezuela se aproxima al

6-8% de la población, aunque existen zonas geográficas de población indígena en las que esta prevalencia puede superar el 20% (2, 3).

La detección precoz mediante tamizaje reduce considerablemente el riesgo de adquisición de la enfermedad mediante las transfusiones sanguíneas (4). Sin embargo, existen dos situaciones en el transcurso de la enfermedad en las que esta detección no resulta eficaz. Una de ellas ocurre en la fase aguda de la infección, donde existe un período ventana cuando el HBsAg puede ser indetectable si no existe suficiente cantidad en suero (5). La otra situación puede suceder durante las fases crónicas de la infec-

ción, se denomina infección por el “virus oculto” y se define como la presencia de ADN viral en sangre o tejidos hepáticos de pacientes con el HBsAg negativo. Se producen ciertas mutaciones en la región superficial genómica del HBsAg, que liberan a la sangre partículas que no son detectadas por métodos rutinarios (1). La prevalencia de este tipo de infecciones por “virus oculto” en donantes de sangre en Venezuela oscila entre el 4 y el 7% (6, 7).

Las mutaciones del antígeno plantean un problema potencial para los servicios de donaciones y transfusiones de sangre (5), lo que constituye el riesgo residual de contraer hepatitis B. Este riesgo residual de infecciones virales transmitidas mediante donaciones se ha estimado en diversos estudios, y oscila entre 1:63.000 y 1:205.000 (8).

En la última década se han desarrollado nuevas técnicas serológicas que detectan antígeno-core (HBcAg) en suero, y también nuevos métodos de biología molecular, denominadas técnicas de amplificación del ADN genómico “*nucleic acid testing*” (NAT), que permiten la detección de partículas del ADN viral de la hepatitis B, independientemente de la fase en la que se encuentre la infección vírica, mediante la realización de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (9). Estos métodos aumentan la sensibilidad del tamizaje, por lo que el riesgo de contracción de la infección mediante transfusiones puede reducirse (8).

Recientemente se han desarrollado técnicas NAT (Procleix Ultrio, TaqScreen) que incorporan la detección simultánea del virus de inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis C (VHC) y VHB. Esto hace que sea más factible el tamizaje en laboratorios de diagnóstico (10-12).

El objetivo de esta revisión ha sido evaluar las técnicas de amplificación genómica (NAT) para el tamizaje de hepatitis B en donantes de sangre, para su posible

aplicación en los laboratorios clínicos y microbiológicos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó una revisión sistemática de literatura (julio 2008). Para ello se utilizaron las bases de datos Medline y Embase, así como la Red Internacional de Agencias de Evaluación (INAHTA), Cochrane Library, el registro de ensayos clínicos *clinicaltrial.gov* y EuroScan. También se revisaron manualmente revistas relacionadas con la materia, como *Transfusion*, *Vox Sanguinis* y *Hepatology*.

Los criterios de inclusión fueron la localización de estudios que evalúen los diferentes métodos diagnósticos, basándose en técnicas de amplificación genómica (NAT). La población eran adultos sanos y la intervención consistía en el tamizaje de hepatitis B con técnicas NAT, comparándolas con métodos serológicos de detección de marcadores de hepatitis B.

Se realizó una lectura crítica y una síntesis cualitativa de los artículos seleccionados, valorando la metodología empleada en los mismos mediante la aplicación de una lista de comprobación realizada *ad hoc* para las series de casos y el cuestionario “Quadas” para los estudios de pruebas diagnósticas (13). El fin del estudio fue comparar las diferentes técnicas NAT para el tamizaje de hepatitis B en donantes de sangre.

## RESULTADOS

Tras la realización de la búsqueda sistemática se localizaron un total de 146 referencias bibliográficas, incluyendo finalmente 12 trabajos que cumplían todos los criterios de inclusión. Se recuperaron 11 series de casos y 1 estudio de pruebas diagnósticas (Fig. 1). La calidad de los estudios incluidos ha sido moderada.

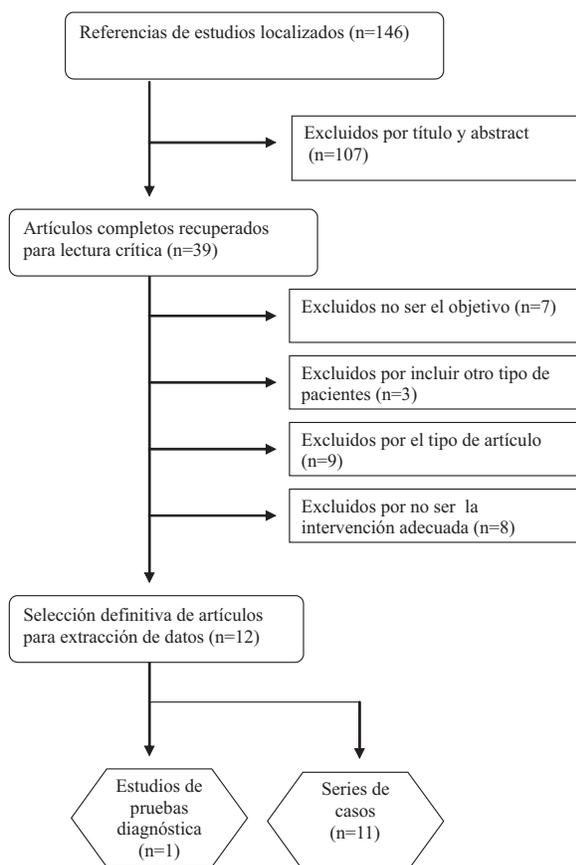


Fig. 1. Esquema general de la selección de estudios.

Las principales características de los estudios se exponen en la Tabla I, donde se han agrupado en cuatro bloques. El primero de ellos incluye cuatro trabajos de series de casos que utilizaban distintos dispositivos y métodos analíticos de fabricación propios para realizar el tamizaje a partir de colecciones de muestras sanguíneas durante periodos de tiempo determinados (8, 14-16). El segundo bloque también contiene tres estudios de series de casos (11, 17, 18) que empleaban el dispositivo Procleix Ultrio Assay (Chiron) para el tamizaje mediante la utilización de muestras individuales, sin realizar grupos. El tercero engloba los artículos que utilizaban la tecnología Amplimax MPX (Roche), cuatro series de casos (9, 19-21), donde se utilizaron siem-

pre *pool* de 50 muestras. Finalmente, el cuarto grupo lo constituye el trabajo con metodología de estudio de pruebas diagnósticas, que comparaba dos técnicas.

El total de muestras fue superior a 69,82 millones y el periodo de los estudios abarcaba de 1997 hasta 2005, con duración variable desde siete meses (17) hasta nueve años (8), aunque tres trabajos (11, 14, 18) no aportaron información sobre el periodo de realización del estudio.

Las determinaciones NAT mediante la elaboración de PCR caseras (8, 14-16) ofrecieron resultados dispares, ya que la instrumentación utilizada en cada caso fue distinta.

El dispositivo Procleix se describía en dos trabajos (17, 18), y realizaban un tamizaje a partir del número total de muestras analizadas (12.224 y 5.083 respectivamente). El resultado determinado era el número de muestras positivas detectadas con NAT que no dieron positivo con el HBsAg, que fue de 6 (0,05%) y 7 (0,13%) respectivamente. El otro estudio de este bloque (11) utilizó 135 muestras de pacientes que recibían terapia anti-VHB y que tenían negativizado el HBsAg, obteniéndose como resultado 108 muestras positivas mediante técnicas NAT para el ADN viral (80%).

En los estudios que utilizaban la tecnología Amplimax MPX, todos excepto uno (19) utilizaron un número alto de muestras, comprendido entre 7,2 y 16 millones, donde el porcentaje de muestras identificadas mediante subgrupos positivas para la hepatitis B y que presentaron HBsAg negativo estuvieron comprendidas en un rango de entre 0,083 y 0,0015%.

El estudio de pruebas diagnosticas localizado (10) comparaba las dos técnicas NAT, y ambas resultaron tener la misma sensibilidad para la detección del ADN viral. El total de ADN de VHB detectado fue de cuatro muestras (0,038%), que resultaron ser HBsAg-negativo. De estas cuatro mues-

**TABLA I**  
**PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS ESTUDIOS ANALIZADOS**

Autor Año	Tipo de estudio	Instrumentación utilizada (NAT)	Tratamiento de la muestra	Número de muestras	Período de tiempo	Muestras positivas sólo con NAT (%)
Hourfar (8) 2008	Serie	PCR casera	ND	31.524.571	1997-2005	43 (0,00013%)
Roth (14) 2002	Serie	Subgrupos PCR	Grupos de 96	3.600.000	ND	6 (0,00016%)
Chevrier (15) 2007	Serie	Hep-B Kit	ND	1.169	Oct 04-nov 05	12 (1,03%)
Chiquete (16) 2005	Serie	PCR casera	Grupos de 100	100 HBsAg negativo	Feb 99-mar 05	1 (1%)
Makroo (17) 2008	Serie	Procleix Ultrio Assay	Individual	12.224	Jun 04-ene 05	6 (0,05%)
Nantachit (18) 2007	Serie	Procleix Ultrio Assay	Individual	5.083	ND	7 (0,13%)
Katsoulidou (11) 2007	Serie	Procleix Ultrio Assay	Individual	135 HBsAg negativo	ND	108 (80%)
Satake (9) 2007	Serie	Amplimax MPX (Roche)	Grupos de 50	15.721	1997-20 04	13 (0,083%)
Mine (19) 2003	Serie	Amplimax MPX (Roche)	Grupos de 50	16.012.175	Ene 00-jun 02	308 (0,0019%)
Minegishi (20) 2003	Serie	Amplimax MPX (Roche)	Grupos de 50	11.403.327	Feb 00-oct 01	181 (0,0015%)
Ohnuma (21) 2001	Serie	Amplimax MPX (Roche)	Grupos de 50	7.240.288	Feb 00-abr 01	112 (0,0015%)
Margaritis (10) 2007	Compara técnicas	-Procleix Ultrio Assay -Amplimax MPX (Roche)	Individual Grupos de 6	10.397	Sep 05-dic 05	4 (0,038%) -Procleix: 2 -MPX: 2

PCR: reacción en cadena de la polimerasa. VHB-DNA: ADN del virus de la hepatitis B. NAT: nucleotidic acid testing. HBsAg; antígeno de superficie. ND: no descrito.

tras positivas, mediante el sistema individualizado (Procleix) se identificaron dos muestras y mediante el sistema de subgrupos de seis (MPX) otras dos diferentes.

## DISCUSIÓN

Las tecnologías NAT, basadas en técnicas de biología molecular han constituido un avance extraordinario en los últimos años para el tamizaje de la hepatitis B, hepatitis C y VIH, principalmente en los centros de transfusiones y donantes de sangre (8, 12). La mayoría de los estudios analizados realizan la determinación simultánea de los tres virus (*multiplex*), tal como se realiza en la actualidad en muchos laboratorios clínicos, ya que estos dispositivos están capacitados para ello. Los datos obtenidos para los tamizajes de hepatitis B ofrecen resultados alentadores, ya que se identifican como positivas muchas muestras, que de otro modo se hubieran pasado por alto. Tanto el tamizaje mediante muestras individuales, como mediante grupos poseen buena sensibilidad, pero quizás son más fiables los resultados que utilizan grupos, ya que el número de muestras ha sido muy superior a los otros.

Otros estudios obtienen conclusiones similares a este trabajo de revisión; en el periodo 2001-2002 en Alemania (8), sin la utilización de técnicas NAT, se estimaba el riesgo de una infección no detectada en uno por 230.000 para el virus de la hepatitis B. Con la tecnología NAT en subgrupos, este riesgo representa un caso por 620.000 para el VHB. Estos resultados muestran que la utilización del NAT reduce todavía más el riesgo de entrada de donaciones infecciosas en el suministro sanguíneo.

Aunque las técnicas de tamizaje se proponen como las prueba con mayor rendimiento diagnóstico, hay que ser cautelosos en la interpretación de los resultados de los estudios publicados en relación con el tami-

zaje de la hepatitis B, dado que también se han registrado resultados en los que si se utilizan solamente las técnicas NAT para el tamizaje, pueden no detectarse algunos resultados que son positivos mediante la realización de antígeno de superficie en suero (HBsAg) (6, 7). También se ha notificado la existencia de falsos positivos mediante estas técnicas. Esta última circunstancia hace que sea recomendable siempre confirmar estos resultados mediante la determinación posterior de otra prueba. En relación a la utilización rutinaria para el tamizaje de técnicas NAT en muestras individuales o mediante la realización de diluciones en grupos, existen resultados controvertidos.

Los estudios de series de casos analizados que han realizado grupos lo hacen normalmente mediante diluciones con 50 muestras, mientras que el estudio de pruebas diagnósticas lo hace con grupos de 6, que sería lo que se determinaría en un laboratorio en el que se implantase esta tecnología, por lo que los resultados pueden no ser extrapolables. En cuatro estudios se han realizado técnicas NAT mediante el empleo de PCR y *primers* "caseros", por lo que estos resultados tampoco pueden compararse con los dos dispositivos evaluados de las casas comerciales Chiron y Roche.

Una limitación común a todos los trabajos de revisión, que tampoco puede obviarse en éste, es la existencia de sesgo de publicación, que se ha tratado de limitar mediante la búsqueda en distintas bases de datos, literatura gris y sin restricción de idioma. Otra posible limitación podría ser la región geográfica donde se han desarrollado los estudios, la mayoría en Japón y Alemania, con características epidemiológicas diferentes, por lo que los resultados no pueden ser comparados entre sí. Además de los estudios descritos, de moderada calidad metodológica, se han localizado dos ensayos clínicos en marcha desde 2007: un ensayo clínico no aleatorizado se desarrolla en

Taiwán, de laboratorios Novartis, para detectar mediante TMA Assay el VHB en donantes de sangre y otro evalúa actualmente el dispositivo 201s Taq Screen MPX (Roche) para el tamizaje de la hepatitis B y se está realizando en Estados Unidos.

En términos generales los sistemas NAT pueden constituir un avance significativo en la automatización de los bancos de sangre y aumentan la seguridad de los pacientes que reciben sangre donada, aunque la combinación con la determinación de los antígenos HBsAg y HBcAg sería la ideal para un correcto tamizaje (22, 23). Las dos técnicas por separado poseen buena capacidad de detección, constituyendo herramientas fundamentales y complementarias a la determinación del antígeno de superficie en suero para un correcto tamizaje en centros de transfusiones. Ambas tienen sensibilidad similar para el tamizaje de Hepatitis B. Sin embargo, el alto coste que implican las nuevas técnicas de detección requerirían de un análisis de eficiencia, en este sentido, aunque no se ha realizado un búsqueda exhaustiva al respecto, algunos autores afirman que las técnicas NAT no pueden considerarse una intervención coste-efectiva pues supera con creces los umbrales de aceptabilidad utilizados habitualmente en cuanto a la tasa de coste-efectividad incremental (ICER) con valores que ascienden a 1,5 millones de dólares por año de vida ajustado por calidad ganado (QALY)(24).

Sería necesario en un futuro la realización de nuevos estudios de pruebas diagnósticas con esta nueva tecnología, con un mayor número de muestras y utilizando patrones estándares, para poder determinar así la mayor sensibilidad diagnóstica de una técnica frente a otra y su comparación en términos de coste.

#### REFERENCIAS

1. Manzini P, Girotto M, Borsotti R, Giachino O, Guaschino R, Lanteri M, Testa D, Ghiazza P, Vacchini M, Danielle F, Pizzi A, Valpreda C, Castagno F, Curti F, Magistroni P, Abate ML, Smedile A, Rizzetto M. Italian blood donors with anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Haematologica* 2007; 92:1664-1670.
2. Loureiro CL, Alonso R, Pacheco BA, Uzcátegui MG, Villegas L, León G, De Saéz A, Liprandi F, López JL, Pujol FH. High Prevalence of GB Virus C/Hepatitis G Virus Genotype 3 among autochthonous venezuelan populations. *J Med Virol* 2002; 68:357-362.
3. Monsalve-Castillo F, Echevarría JM, Atencio R, Suárez A, Estévez J, Costa-León L, Montiel P, Molero T, Zambrano M. Alta prevalencia de la infección por el virus de hepatitis B en la comunidad indígena Japreira, estado Zulia, Venezuela. *Cad Saúde Pública* 2008; 24: 1183-1186.
4. Kuhns C, Kleinman SH, McNamara AL, Rawal B, Glynn S, Busch MP. Lack of correlation between HBsAg and HBV DNA levels in blood donors who test positive for HBsAg and anti-HBc: implications for future HBV screening policy. *Transfusion* 2004; 44:1332-1339.
5. Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Chakraborty S, Basu SK, Chakravarty R. Detection of a premature stop codon in the surface gene of hepatitis B virus from an HBsAg and anti-HBc negative blood donor. *J Clin Virol* 2007; 40:255-258.
6. Gutiérrez C, León G, Loureiro CL, Uzcátegui N, Liprandi F, Pujol FH. Hepatitis B Virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 5:768-770.
7. Gutiérrez C, Devesa M, Loureiro CL, León G, Liprandi F, Pujol FH. Molecular and serological evaluation of surface antigen negative Hepatitis B virus infection in blood donors from Venezuela. *J Med Virol* 2004; 73:200-207.
8. Hourfar MK, Jork C, Schottstedt V, Weber-Schehl M, Brixner V, Busch MP, Geusendam G, Gubbe K, Mahnhardt C, Mayr-Wohlfart U, Pichl L, Roth WK, Schmidt M, Seifried E, Wright DJ, German Red Cross NAT Study Group. Experi-

- ence of German red cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus and hepatitis B virus. *Transfusion* 2008; 48:1558-1566.
9. **Satake M, Taira R, Yugi H, Hino S, Kanemitsu K, Ikeda H, Tadokoro K.** Infectivity of blood components with low hepatitis B virus DNA levels identified in a lookback program. *Transfusion* 2007; 47:1197-1205.
  10. **Margaritis AR, Brown SM, Seed CR, Kiely P, D'Agostino B, S  ller AJ.** Comparison of two automated nucleic acid testing systems for simultaneous detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA. *Transfusion* 2007; 47:1783-1793.
  11. **Katsoulidou A, Mochidis Z, Sypsa V, Chini M, Papatheodoridis GV, Tassopoulos N.** Analytical and clinical sensitivity of the Procleix Ultrio HIV-1/HCV/HBV assay in samples with a low viral load. *Vox Sang* 2007; 92:8-14.
  12. **Japanese Red Cross Society.** Activities of Japanese Red Cross Blood Programme 2008. Disponible en: <http://www.jrc.or.jp/english/activity/blood.html>.
  13. **Whiting PF, Westwood ME, Rutjes AWS, Reitsma JB, Bossuyt PNM, Kleijnen J.** Evaluation of QUADAS, a tool for the quality assessment of diagnostic accuracy studies. *BMC Med Res Methodol* 2006; 6:9-16.
  14. **Roth WK, Weber M, Petersen D, Drosten C, Buhr S, Sireis W, Weichert W, Hedges D, Seifried E.** NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. *Transfusion* 2002; 42:869-875.
  15. **Chevrier MC, St-Louis M, Perreault J, Caron B, Castilloux C, Laroche J, Delage G.** Detection and characterization of hepatitis B virus of anti-hepatitis B core antigen-reactive blood donors in Québec with an in-house nucleic acid testing assay. *Transfusion* 2007; 47:1794-1802.
  16. **Chiquete E, Sánchez LV, Becerra G, Quintero A, Maldonado M, Panduro A.** Performance of the serologic and molecular screening of blood donations for the hepatitis B and C viruses in a Mexican Transfusion Center. *Ann Hepatol* 2005; 4: 275-278.
  17. **Makroo RN, Choudhury N, Jagannathan L, Parihar-Malhotra M, Raina V, Chaudhary RK, Marwaha N, Bhatia NK, Ganguly AK.** Multicenter evaluation of individual donor nucleic acid testing (NAT) for simultaneous detection of human immunodeficiency virus-1 and hepatitis B&C viruses in Indian blood donors. *Indian J Med Res* 2008; 127:140-147.
  18. **Nantachit N, Thaikrua L, Thongsawat S, Leetrakool N, Fongsatikul L, Sompan P, Fong YL, Nichols D, Ziermann R, Ness P, Nelson KE.** Evaluation of a multiplex human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus nucleic acid testing assay to detect viremic blood donors in northern Thailand. *Transfusion* 2007; 47:1803-1808.
  19. **Mine H, Emura H, Miyamoto M, Tomono T, Minegishi K, Murokawa H, Yamanaka R, Yoshikawa A, Nishioka K; Japanese Red Cross NAT Research Group.** High throughput screening of 16 million serologically negative blood donors for hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type-1 by nucleic acid amplification testing with specific and sensitive multiplex reagent in Japan. *J Virol Methods* 2003; 112:145-151.
  20. **Minegishi K, Yoshikawa A, Kishimoto S, Yugi H, Yokoya N, Sakurada M, Kiyokawa H, Nishioka K; Japanese Red Cross NAT Screening Research Group.** Superiority of minipool nucleic acid amplification technology for hepatitis B virus over chemiluminescence immunoassay for hepatitis B surface antigen screening. *Vox Sang* 2003; 84:287-291.
  21. **Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R, Lizuka HY, Miyamoto M, Satoh S, Nakahira S, Tomono T, Murozuka T, Takeda Y, Doi Y, Mine H, Yokoyama S, Hirose T, Nishioka K. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group.** The first large-scale nucleic acid amplification testing (NAT) of donated blood using multiplex reagent for simultaneous detection of HBV, HCV, and HIV-1 and signifi-

- cance of NAT for HBV. *Microbiol Immunol* 2001; 45:667-672.
22. **Bush MP.** Should HBV DNA NAT replace HBsAg and/or anti-HBe screening of blood donors?. *Transfusion* 2004; 11:26-32.
  23. **Kuhns MC, Busch MP.** New strategies for blood donor screening for hepatitis B virus: nucleic acid testing versus immunoassay methods. *Mol Diagn Ther* 2006; 10:77-91.
  24. **Marshall DA, Kleinman SH, Wong JB, AuBuchon JP, Grima DT, Kulin NA, Weinstein MC.** Cost-effectiveness of nucleic acid test screening of volunteer blood donations for hepatitis B, hepatitis C and human immunodeficiency virus in the United States. *Vox Sang* 2004; 86:28-40.