

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS PARA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN DONANTES DE PLASMA PARA EL TRATAMIENTO DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

MARIA DEL CARMEN SAAVEDRA, ANA MARIA BRIGGILER, DELIA ENRIA, LAURA RIERA,
ANA M. AMBROSIO

*Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Dr. Julio I. Maiztegui (INEVH), Pergamino,
Provincia de Buenos Aires*

Resumen La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad causada por el virus Junin (VJ) cuyo único tratamiento efectivo es la transfusión de plasma inmune (PI) obtenido de convalecientes de la enfermedad. Dado que el virus de la Hepatitis C (HCV) se transmite principalmente por vía parenteral, en este trabajo se intentó estimar la prevalencia de anticuerpos anti-HCV en una población de donantes de un banco de PI. Se estudiaron retrospectivamente 253 convalecientes de FHA y 123 en forma prospectiva, quienes concurren al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) a donar PI entre 1991 y 1995. Como población control se estudiaron 95 individuos que tuvieron FHA pero no fueron transfundidos con PI y un grupo de 88 individuos pertenecientes al personal del INEVH. Mediante pruebas de ELISA de 2° generación, confirmadas por LIA-TEK se detectaron anticuerpos anti-HCV en 29/376 donantes (7,7%). Sólo uno de los 95 individuos del grupo control fue anti-HCV positivo (1,0%) y uno de los 88 individuos del personal fue anti-HCV positivo (1,1%). El análisis retrospectivo de la seroconversión para HCV demostró que en 16/24 donantes (66,6%) la infección por HCV estuvo probablemente asociada a la transfusión de PI. Los datos presentados enfatizan los riesgos asociados a prácticas transfusionales y las posibilidades de su prevención. En el caso de la FHA, la demostración de la inocuidad, inmunogenicidad y eficacia protectora de la vacuna Candid 1 contra la FHA, señala la necesidad de la vacunación para evitar esta enfermedad y los riesgos de su tratamiento.

Palabras clave: hepatitis C, transfusión, fiebre hemorrágica argentina

El virus de la hepatitis C (HCV) identificado como el principal agente etiológico de la hepatitis post transfusional no A, no B^{1, 3} se transmite principalmente a través de vías parenterales: transfusiones sanguíneas, hemodiálisis y empleo de drogas por vía endovenosa. Aunque la hepatitis C (HC) en su etapa aguda es generalmente subclínica, se estima que más del 50% de los infectados desarrollan una hepatitis crónica, que

evoluciona en muchos casos hacia una cirrosis, carcinoma hepatocelular o ambos^{4, 5}.

Por otra parte, la fiebre hemorrágica argentina (FHA), enfermedad causada por el Virus Junin (VJ), es endémica en un área geográfica de nuestro país, que abarca parte de las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y La Pampa (Fig. 1). Esta enfermedad febril afecta principalmente a personas que viven y/o trabajan en zonas rurales, y para ella existe un tratamiento específico que consiste en la transfusión de plasma inmune (PI)⁶. Este plasma se obtiene de convalecientes que han padecido la enfermedad y poseen anticuerpos neutralizantes específicos para el VJ. Se ha demostrado que este tratamiento es efectivo cuando el PI se suministra en dosis ade-

Recibido: 10-VII-1996

Aceptado: 20-III-1997

Dirección postal: Dra. María del Carmen Saavedra, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, Monteagudo 2510, 2700 Pergamino, Provincia de Buenos Aires, Argentina

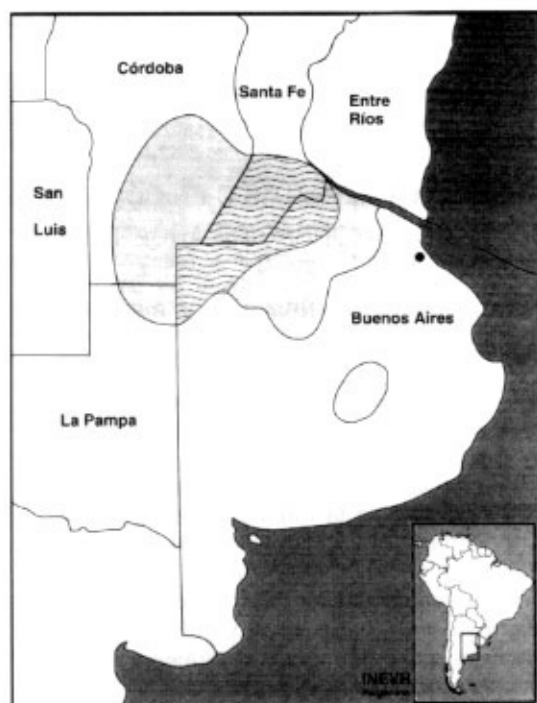


Fig. 1.— Area endémica de la FHA y de procedencia de los donantes del banco de plasma del INEVH.

■ Area endémica de FHA. ▨ Area de procedencia de los donantes estudiados.

cuadas, dentro de los 8 días del comienzo de los síntomas. En la determinación de las dosis terapéuticas de plasma para este tratamiento interviene de manera decisiva el título de anticuerpos neutralizantes contra el VJ7, lo que resulta generalmente en la transfusión de varias unidades de plasma (UP), procedentes de distintos donantes.

Esta práctica terapéutica generó la necesidad de organizar bancos de PI para la pronta disponibilidad del mismo en los lugares de tratamiento. Previo a su almacenamiento, cada UP es sometida a los controles serológicos establecidos para los bancos de sangre y/o hemoderivados (HCV, HBsAg, chagas, HIV, sífilis, brucelosis).

En el presente trabajo se estudió prospectiva y retrospectivamente la ocurrencia de anticuerpos anti-HCV en las UP, con el objeto de estimar la prevalencia de infección por HCV entre los donantes del banco de plasma del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH). Además se buscó la asociación entre la seroconversión en los individuos anti-HCV positivo y la transfusión de PI y la correlación entre el número de UP recibidas y la presencia de anticuerpos anti-HCV.

Material y métodos

a) Sujetos

Se estudiaron retrospectivamente 253 convalecientes de FHA (216 hombres y 37 mujeres), que concurren al INEVH a donar plasma en 1991 y en forma prospectiva 123 donantes (113 hombres y 10 mujeres), que concurren en el periodo 1992-1995. La edad promedio fue de 38 ± 11 (18-66) años. Todos ellos residían en el área endémica de la FHA, específicamente el área rural del sur de la provincia de Santa Fe y norte de la provincia de Buenos Aires (Fig. 1).

La historia de los donantes en relación a la recepción de PI se investigó recurriendo a los archivos clínicos y epidemiológicos del INEVH.

b) Controles

Se eligieron dos grupos controles:

95 individuos (71 hombres y 24 mujeres) que tuvieron FHA entre 1991-1995 pero no fueron transfundidos con PI, de edad promedio 42 ± 16 (8-76) años, y residentes en el área rural del sur de la provincia de Santa Fe y norte de la provincia de Buenos Aires.

- 88 individuos del personal del INEVH (31 hombres y 57 mujeres) que, por razones de bioseguridad de la institución, se controlan serológicamente para HCV y otras posibles infecciones, dos veces al año, y cuya edad promedio fue 40 ± 11 (21-61) años.

c) Muestras de sueros

Las muestras de los donantes fueron obtenidas en el momento de extracción de plasma; las de los enfermos de FHA que no recibieron PI fueron extraídas durante la convalecencia de la enfermedad y las del personal del INEVH durante la encuesta sanitaria del personal entre los meses de marzo y abril de 1994. Todos los sueros fueron conservados a -40°C hasta su utilización.

En aquellos casos con serología positiva para HCV en los que fue posible identificar a sus donantes de PI, se recurrió a la seroteca del INEVH para el estudio de las muestras de suero disponibles.

d) Pruebas serológicas para detectar anticuerpos anti-HCV

Se buscaron los anticuerpos anti-HCV usando como método de tamizaje una técnica de ELISA de 2da Generación (Abbott, HCV EIA, Alemania). Los sueros anti-HCV positivo fueron repetidos por la misma técnica y confirmados por una técnica de inmunoblotting (Organon Teknika S.A., LIA-TEK HCV III, Irlanda) que consiste en un enzimoimmunoensayo lineal, basado en el principio de

sandwich, que utiliza una tira recubierta con varios antígenos del HCV E₁/NS₁, NS₂, NS₃ y proteínas del core en forma de banda o línea.

e) Pruebas estadísticas

Para estimar el riesgo de infección por HCV asociada a la transfusión de PI, se calculó el OR (odd ratio: razón de suertes) y el test de chi cuadrado.

La relación entre el número de UP transfundidas y el nivel de riesgo para contraer HC se analizó mediante el test chi cuadrado de tendencia para proporciones.

Resultados

Entre las 376 muestras estudiadas de los hemodonantes, se detectaron 29 (7,7%) con anticuerpos anti-HCV. En 298 de los 376 donantes se pudo disponer de información acerca de si habían sido previamente transfundidos, resultando que 272/298 (91,2%) habían sido receptores de PI. Veintiocho de los 29 individuos seropositivos habían sido transfundidos en el período 1977-1991, cuando cursaron la FHA. El restante recibió PI en 1994, teniendo sus donantes serología negativa para HCV.

Dentro de los 95 individuos del primer grupo control (convalecientes que no recibieron PI), sólo uno resultó anti-HCV positivo (1,0%). En este caso no se pudieron conocer otros antecedentes transfusionales. Por otra parte, uno de los 88 individuos del segundo grupo control (personal del INEVH) fue anti-HCV positivo (1,1%). Este individuo había recibido PI en el año 1989 ante la sospecha de infección accidental por VJ. El análisis retrospectivo de muestras de las UP transfundidas reveló que uno de sus donantes era anti-HCV positivo.

Para analizar el riesgo que representó en esta población la transfusión con PI, se clasificó a los enfermos de FHA según sus antecedentes transfusionales, observándose en los individuos transfundidos un riesgo al menos 2, 3 veces mayor de infectarse con HCV que los que no recibieron este tratamiento ($p = 0,0014$) (Tabla 1).

La Tabla 2 muestra los resultados serológicos de los 29 individuos con serología positiva para HCV y su distribución de acuerdo con la serología de las unidades de PI recibidas. En 20 de estos 29 individuos, se obtuvo información completa respecto de la serología de todas las UP recibidas por ellos: en 11 de ellos (55,0%) que inte-

TABLA 1.— Asociación entre la infección con HCV y la transfusión con PI en pacientes con diagnóstico de FHA

	Serología para HCV			Total
		Positiva	Negativa	
Transfundido con PI	Sí	29	243	272
	No	1	120	121
	Total	30	363	393

OR: 143, (2,3 < OR < 589,7)

χ^2 : 10,14 ($p = 0,0014$)

gran el grupo A de la Tabla 2, al menos una de las unidades de PI recibidas tenía anticuerpos para HCV, y en 9 individuos (45,0%) (grupo B), todas las unidades recibidas tenían serología negativa para HCV. En los 9 individuos restantes (grupo C) no se dispuso de la totalidad de las unidades de PI recibidas, aunque las estudiadas resultaron negativas para HCV.

En 24/29 individuos anti-HCV positivo se realizaron estudios de muestras secuenciales de suero para determinar el momento de la seroconversión, demostrándose que 16/24 (66,6%) individuos seroconvirtieron entre los 30 días y el año post transfusión de PI. No descartándose la posibilidad de que en algunos casos las Igs anti-HCV detectadas en las determinaciones iniciales fuesen anticuerpos pasivos; en el individuo n° 2 se detectaron anticuerpos anti-HCV a los 5 días post transfusión de PI y en el individuo n° 22 a los 14 y 30 días. En este último, los anticuerpos fueron indetectables a los 2 meses, reapareciendo a los 3 meses post transfusión, lo que se interpretó como el comienzo de una respuesta propia.

Los primeros 8 individuos del grupo A (Tabla 2) seroconvirtieron entre los 30 días y el año post transfusión del PI. En los individuos n° 9, 10 y 11 no fue posible determinar la seroconversión.

Los individuos n° 12, 13, 14, 15 y 16 del grupo B (Tabla 2) seroconvirtieron entre dos meses y un año post transfusión de PI, y los cuatro restantes (n° 17, 18, 19 y 20) permanecieron con serología negativa para HCV entre uno y tres años post transfusión.

Los individuos n° 21, 22 y 23 del grupo C seroconvirtieron entre el segundo mes y el año post transfusión del PI; los 4 siguientes (n° 24, 25, 26 y 27) permanecieron con serología nega-

TABLA 2.— Cinética de aparición de anticuerpos para el virus de la hepatitis C en donantes seropositivos para hepatitis C

	pre-plas.	1er mes	2do mes	3/6 ^o mes	7/12 ^o mes	2 años	3 años	4 años	5 años	6 años	>6 años
	1	Neg	Pos	Pos	Pos	Pos		Pos	Pos		
	2	Neg		Pos	Pos	Pos			Pos		
G	3	Neg	Pos↓	Pos	Pos			Pos			
R	4	Neg	Pos↓		Pos	Pos					
U	5	Neg	Neg	Neg		Pos	Pos			Pos	
P	6	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos				
O	7		Neg		Pos	Pos	Pos			Pos	
	8		Neg	Pos	Pos	Pos					
A	9		Pos		Pos		Pos				
	10		Pos	Pos	Pos			Pos			
	11					Pos				Pos	
	12	Neg	Neg	Pos	Pos	Pos		Pos			
G	13	Neg	Neg	Neg	Pos	Pos					
R	14	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos					
U	15		Neg	Neg	Pos		Pos	Pos			
P	16			Neg		Pos	Pos	Pos	Pos		
O	17					Neg		Pos			Pos
	18	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	Pos			Pos
B	19	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg		Pos	Pos		
	20	Neg	Neg	Neg		Neg	Pos		Pos		Pos
	21	Neg	Neg	Neg	Neg	Pos		Pos			
G	22	Neg	Pos↓	Neg	Pos	Pos					Pos
R	23	Neg	Neg	Pos	Pos					Pos	Pos
U	24	Neg	Neg	Neg	Neg		Neg	Pos	Pos		
P	25	Neg	Neg		Neg	Neg		Pos			
O	26	Neg	Neg	Neg			Neg				Pos
	27					Neg	Neg			Pos	Pos
C	28					Pos		Pos	Pos	Pos	
	29					Pos					Pos

Grupo A: Recibieron plasma inmune con serología positiva para HCV.
 Grupo B: Recibieron plasma inmune con serología negativa para HCV.
 Grupo C: Algunas de las unidades de plasma inmune recibida no fueron estudiadas.
 Pre Plasma: Previo al tratamiento con PI; Pos: Positivo; Neg: Negativo

tiva para HCV entre 1 y 2 años post transfusión, detectándose anticuerpos para HCV en muestras obtenidas a partir del tercer año y hasta el sexto año post transfusión. En los individuos n° 28 y 29 no fue posible detectar la seroconversión.

El estudio de la relación entre el número de UP recibidas y la presencia de anticuerpos anti-HCV (Tabla 3), mediante el análisis de chi cuadrado para tendencia de proporciones⁸, no permitió demostrar que el incremento en el número

de unidades transfundidas aumente significativamente el riesgo de ser infectado con el HCV (p = 0,16707).

En la Fig. 2 se presenta un esquema de la probable transmisión del HCV desde 5 a 17 individuos, basado en el estudio retrospectivo de los registros epidemiológicos de los donantes. Se observó que desde el individuo 20 se habrían infectado 5 personas, desde el D, otras cuatro, y así sucesivamente, multiplicando la infección en

TABLA 3.— Distribución de los individuos con serología positiva para HCV en función de las unidades de plasma transfundidas

	Unidades de plasmas transfundidas		
	1	2	3 ó más
HCV +	5	12	12
HCV -	75	91	77
Total	80	103	89
Porcentaje	6,2%	11,6%	13,5%
OR respecto a 1er grupo	1	1,98	2,34

χ^2 : 1,909 (p = 0,16707)

la población estudiada. Si bien en un 40% del total de infectados con HCV puede no ser evidente la fuente de contagio, en este estudio la mayor probabilidad se asocia a la transfusión del PI.

Discusión

En el presente estudio de la ocurrencia de anticuerpos contra el HCV en donantes de plasma para el tratamiento de la FHA, se detectó la presencia de anticuerpos en 29/376 (7,7%) donantes. Estos resultados demuestran un alto porcentaje de infección por HCV en el banco de plasma del INEVH, comparada con la prevalencia reportada para otros bancos de sangre (0,5-1,5%)^{9, 11}. En la misma población de donantes no se detectaron individuos con serología positiva para HIV¹², encontrándose 1,3% de positivos para chagas, 0,5% para sífilis y 0,8% portadores del HBsAg. Estos datos enfatizan el significativamente alto porcentaje de infección para HCV. Una posible explicación para esta diferencia es que los donantes eran convalecientes de FHA, habiendo sido la mayoría de ellos transfundidos con PI entre 1977 y 1991 antes de la implementación de la técnica de tamizaje para HCV. Por esta razón se intentó determinar si la transfusión de PI había sido su fuente de infección.

En 8 individuos pertenecientes al grupo A (Tabla 2) se pudo evidenciar en forma directa la transmisión del HCV vía la transfusión de PI: donante HCV positivo → receptor HCV positivo, con aparición de anticuerpos entre los 30 días y el año post transfusión.

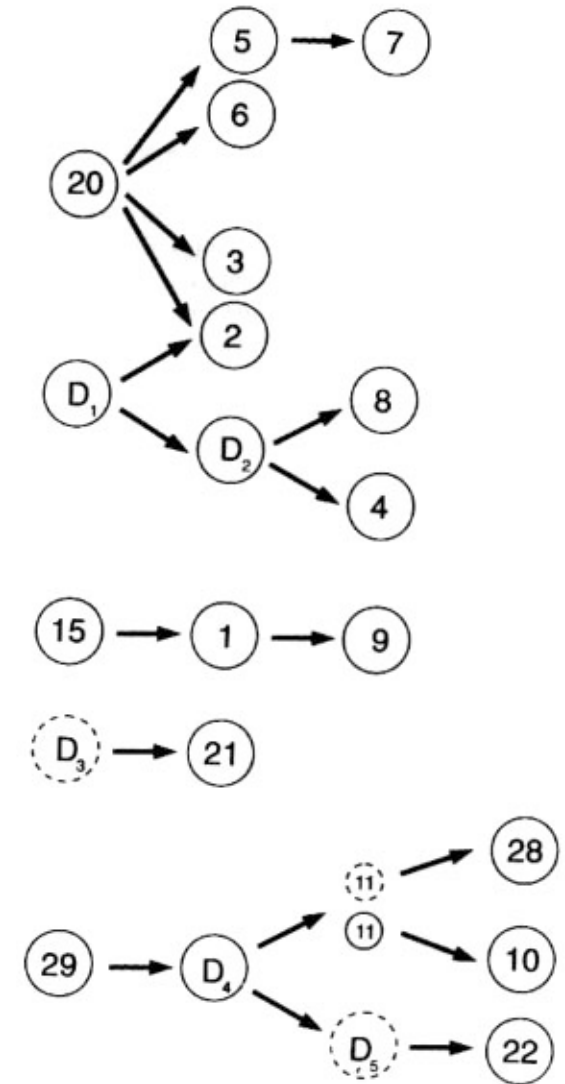


Fig. 2.— Probable transmisión del HCV mediante la transfusión de PI para el tratamiento de la FHA. D: Donantes de PI que no pertenecen al grupo de 29 individuos anti-HCV positivo presentados en la Tabla 2. (D₃): El PI de este donante fue anti-HCV negativo en la fecha de transfusión al individuo 21, siendo positivo un año más tarde. (11): Sin muestra de la UP transfundida al individuo 28, pero fue receptor de una UP anti-HCV positivo. (D₄): Sin muestra de la UP transfundida al individuo 22, pero fue receptor de una UP anti-HCV positivo. Los números de la figura son correspondientes a los de la Tabla 2.

En 5 individuos del grupo B (Tabla 2) se obtuvo evidencia indirecta de la transmisión del HCV vía la transfusión de PI: donante HCV negativo → receptor HCV positivo entre los dos meses y el año post transfusión. En estos cinco individuos

se podría postular la hipótesis de transmisión del HCV por transfusión de plasma anti-HCV negativo de donantes portadores del virus durante el período ventana de la infección¹³.

Con respecto a los individuos del grupo C (Tabla 2), se postuló la hipótesis anterior para el individuo n° 21, que seroconvirtió al año post transfusión, siendo uno de sus donantes anti-HCV negativo en el momento de la misma y positivo un año más tarde. En el individuo n° 22, que seroconvirtió a los cinco meses, se detectaron anticuerpos pasivos post transfusionales a los 14 y 30 días de recibir PI. Esto se atribuyó a que uno de sus donantes, del cual no se obtuvo muestra, probablemente fue seropositivo ya que se encontró que había sido receptor de PI anti-HCV positivo.

En los individuos n° 9, 10 y 11 del grupo A, y 28 y 29 del grupo C, no se pudo determinar si se trataba de una infección previa (se desconocen otros antecedentes transfusionales) o de una seroconversión post transfusión de PI, dándole mayor peso a la segunda opción para los individuos n° 9, 10 y 11 debido a que fueron receptores de PI anti-HCV positivo. La misma vía de contagio fue determinada para el individuo n° 28 al conocerse que uno de sus donantes, que no fue estudiado por no disponerse de la muestra correspondiente, se detectó como positivo un año después de donar plasma y además fue receptor de una UP anti-HCV positivo.

El tiempo transcurrido entre la transfusión de PI y la aparición de anticuerpos anti-HCV sugiere que, en la mayoría de los casos, esta transfusión habría sido la vía de infección de estos individuos^{14, 15}.

La diseminación del HCV en la población estudiada, se hubiera prevenido en al menos el 37,9% de los individuos (11/29) que fueron receptores de una unidad de plasma anti-HCV positivo, si se hubiera podido acceder oportunamente a una técnica de tamizaje para detectar estos anticuerpos.

En trabajos previos Martín y colaboradores¹⁶ reportaron que el riesgo potencial de HC post transfusional aumenta de acuerdo al número de unidades de sangre transfundidas, razón por la cual se estudió también en este trabajo la relación

entre el número de UP recibidas y la presencia de anticuerpos anti-HCV, no pudiéndose corroborar aquellos resultados, probablemente debido a la pequeña muestra estudiada.

Generalizando, para cualquier práctica transfusional, aun usando técnicas de tamizaje para los agentes infecciosos conocidos, quedaría latente el riesgo de infección por donantes en el período ventana, y subyace el riesgo de infección por aquellos agentes todavía desconocidos. En el caso particular de la FHA, a estos riesgos se suma la posibilidad que el 10% de los individuos tratados con PI presente un síndrome neurológico tardío¹⁷.

Los resultados obtenidos permiten concluir que el alto porcentaje de infección por HCV se debió a que la población estudiada fue un grupo cerrado de individuos, algunos de los cuales fueron receptores de plasma anti-HCV positivo, que a su vez donaron su plasma a otros individuos que resultaron infectados, multiplicando así el riesgo asociado a estas prácticas transfusionales. Previo a la instauración de técnicas de tamizaje para HCV en el banco de plasma del INEVH, el riesgo de infección estimado fue al menos 2,3 veces mayor en los enfermos de FHA receptores de PI. Este riesgo debería disminuir sensiblemente a partir de la implementación de técnicas de tamizaje para HCV. Esta evaluación se encuentra en estudio dado que a partir de la vacunación contra la FHA de la población a mayor riesgo, el número de casos ha disminuido significativamente y concomitantemente el número de donantes.

Por otra parte, el PI proveniente de esta población de individuos transfundidos, es el único tratamiento posible en pacientes con FHA, ya que disminuye la letalidad de un 15-30% hasta menos del 1%. La exitosa demostración de la inocuidad, inmunogenicidad y eficacia protectora de la vacuna Candid 1 contra la FHA^{18, 19, 20}, presenta a la prevención como el camino más seguro para evitar esta enfermedad y los riesgos asociados a su tratamiento.

Agradecimientos: A la Dra. Josefa Sottosanti por su participación en la discusión de los contenidos de este trabajo, a la Licenciada María Rosa Feuillade por su colaboración en el análisis de datos, a la Srta. Carina Paz por su ayuda técnica y al personal técnico y de cómputos del INEVH.

Summary

Prevalence of hepatitis C antibodies in donor plasma for the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever

For Argentine Hemorrhagic Fever, a disease caused by Junin virus (JV), there is an effective treatment, consisting of the transfusion of immune plasma (IP). This plasma is obtained from individuals who have had the disease. Since Hepatitis C virus (HCV) is transmitted parenterally, this study was aimed to estimate the prevalence of anti-HCV in a population of IP donors.

In this study, 376 donors (47 females and 329 males) were studied: 95 individuals (24 females and 71 males) who had had FHA but had not received treatment and 88 laboratory workers (57 females and 31 males) who were included as controls.

Serum samples were tested by EIA (Abbott, Germany) for HCV, and later confirmed by LIATEK (Organon, Ireland). Antibodies to HCV were detected in 29/376 donors (7.7%), in only 1/95 (1.0%) untreated convalescents of AHF and in 1/88 (1.1%) of laboratory workers.

Retrospective analysis of the seroconversion for HCV in these individuals demonstrated that in 16/24 donors (66.6%) the infection by HCV was probably associated with the IP transfusion.

The data presented herein show how the infection with HCV was disseminated among donors of IP, stressing the risk associated to transfusional practices, and emphasizing the need of vaccination to prevent AHF and also the risk inherent to its treatment.

Bibliografía

1. Kuo G, Choo QL, Alter HJ, et al. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-4.
2. 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: 359-60.
3. Miyamura T, Saito I, Katayama T, et al. Detection of antibody against antigen expressed by molecularly cloned hepatitis C virus cDNA: application to diagnosis and blood screening for posttransfusion hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 983-7.
4. Levrero M, Tagger A, Balsano C, et al. Antibodies to hepatitis C virus in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1991; 12: 60-3.
5. Colombo M, Kuo G, Choo QL, et al. Prevalence of

- antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1989; 2: 1006-8.
6. Maiztegui JI, Fernández NJ, Damilano AJ. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine Haemorrhagic Fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet* 1979; 2: 1216-7.
7. Enria DA, Briggiler A, Fernández NJ, Levis SC, Maiztegui JI. Importance of dose of neutralizing antibodies in treatment of Argentine Hemorrhagic Fever with immune plasma. *Lancet* 1984; 2: 255-6.
8. Epi Info - Version 6.02, CDC, USA.
9. Stevens CE, Taylor PE, Pindyck J, et al. Epidemiology of hepatitis C virus. A preliminary study in volunteer blood donors. *JAMA* 1990; 263: 49-53.
10. Watanabe J, Minegishi K, Mitsumori T, et al. Prevalence of anti HCV antibody in blood donors in the Tokyo area. *Vox Sang* 1990; 59: 86-8.
11. Hetland G, Skaug K, Larsen J, Meland A, Stromme JH, Storvold G. Prevalence of anti-HCV in Norwegian blood donors with anti-HBc or increased ALT levels. *Transfusion* 1990; 30: 776-9.
12. Conti O, Briggiler AM, Saavedra MC, Enria DA, Maiztegui JI. Prevalencia de infección por HIV en pobladores rurales de las provincias de Santa Fe y Buenos Aires. Primer Congreso Argentino y 2º Simposio Rosarino de Sida. Rosario, Argentina, 1993.
13. Vrieling H, Van der Poel CL, Reesink HW, Zaaijer HL, Lelie PN. Transmission of hepatitis C virus by anti HCV negative blood transfusion. Case report. *Vox Sang* 1995; 68: 55-6.
14. Van der Poel CL, Bresters D, Reesink HW, et al. Early anti hepatitis C virus response with second generation c200/c22 ELISA. *Vox Sang* 1992; 62: 208-12.
15. Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, et al. 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: 1494-500.
16. Martín Y, Marzo L, Cinto F, Delgado P, Buel C. Incidence of anti-HCV and ALT in blood donors. *Sangre* 1990; 35: 197-200.
17. Enria DA, Damilano AJ de, Briggiler AM, et al. Síndrome neurológico tardío en enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina tratados con plasma inmune. *Medicina (Buenos Aires)* 1985; 45: 615-20.
18. Maiztegui JI, McKee KT, Enria DA, et al. Eficacia protectora de la cepa atenuada Candid 1 de virus Junin contra la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). *Medicina (Buenos Aires)* 1991; 51: 467.
19. Barrera Oro JG, McKee KT, Maiztegui JI. Successful development of a vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever. 40th Annual Meeting-American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Boston, MA, 1991.
20. Levis SC, Feuillade MR, Enria DA et al. Persistencia de la inmunidad humoral específica en receptores de la vacuna Candid 1 contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 1993; 53: 131-2.