

## Introduzione delle metodologie di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) per la riduzione del rischio trasfusionale residuo

T. Venezian

*Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

### La sicurezza trasfusionale

La sicurezza degli emocomponenti trasfusi costituisce un obiettivo primario che le istituzioni sanitarie pubbliche ed i trasfusionisti si sono imposti per tutelare la salute dei principali protagonisti del sistema trasfusionale: i donatori ed i riceventi.

La terapia trasfusionale rimane comunque una pratica non esente da rischi, in quanto rappresenta un trapianto di tessuto al quale, come tale, sono associati rischi sia di natura infettiva (virus, batteri, protozoi) che immunologica.

Questo problema assume una maggior rilevanza sociale se consideriamo l'ampio ricorso alla terapia trasfusionale: da una parte assistiamo ad un aumento della richiesta dovuto all'accresciuta attività chirurgica, ai trapianti, all'invecchiamento della popolazione ed alle problematiche connesse; dall'altra, al miglioramento stesso dell'organizzazione e delle tecniche trasfusionali che rendono più agevole e rapida la disponibilità di emocomponenti e la loro stessa infusione.

Il settore trasfusionale ha saputo rispondere con una forte evoluzione tecnico-scientifica che ha portato al miglioramento degli standard qualitativi degli emocomponenti e, allo stesso tempo, al diffondersi della cultura del "buon uso del sangue" e di un sempre più appropriato ricorso alla terapia trasfusionale.

La collaborazione ed integrazione tra le strutture pubbliche, istituzionali, tecniche e di volontariato, consente di perseguire con successo il raggiungimento di obiettivi quali:

- autosufficienza di sangue, emocomponenti, plasmaderivati
- utilizzo ottimale della risorsa sangue
- sicurezza per donatori e pazienti
- qualità
- informazione al cittadino e promozione alla salute
- emovigilanza

Tuttavia, oggi l'approccio alla sicurezza trasfusionale non può limitarsi alle complicanze infettive, già a incidenza molto bassa e destinate a ridursi ulteriormente per l'affinamento delle tecnologie diagnosti-

che e delle procedure di inattivazione, ed il ricorso stesso, quando possibile, all'autotrasfusione per le patologie elettive.

L'approccio dovrà essere globale: dall'accurata selezione del donatore ad un controllo complessivo di tutti i processi finalizzato alla riduzione degli errori umani (la maggior parte dei quali accadono fuori dalle banche del sangue) che oggi rappresentano una fetta consistente delle cause di incidenti trasfusionali.

### Le leggi finalizzate al miglioramento della sicurezza trasfusionale

Il settore trasfusionale è caratterizzato da molteplici normative il cui campo di applicazione spazia dagli aspetti tecnico-scientifici, a quelli medico-legali, a quelli socio-sanitari.

Contenuti etici sono fortemente presenti in molti di questi provvedimenti legislativi, che richiamano l'obbligo all'uso ottimale della risorsa sangue, la gratuità della donazione ed il suo valore sociale e solidaristico, l'obbligo all'emovigilanza, nonché la tutela della salute di donatori e riceventi.

Provvedimenti legislativi hanno guidato negli ultimi decenni anche il percorso verso una sempre maggiore sicurezza trasfusionale, legittimamente pretesa dai cittadini e doverosa dopo il tributo sociale pagato negli anni a causa di emocomponenti infetti.

Nonostante i buoni livelli di sicurezza trasfusionale raggiunti, gli organismi internazionali competenti hanno promulgato normative finalizzate alla massima restrizione possibile della finestra immunologica, introducendo nella diagnostica virale di emocomponenti e plasmaderivati le tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) che consentono l'identificazione diretta dei componenti virali.

Nel 1997, il CPMP (Committee for Proprietary Medicinal Products) ha emesso la Raccomandazione 390/97 "The introduction of nucleic acid amplification technology for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma pool", che sollecitava i Paesi Membri affinché fossero rilasciati sul

mercato solo emoderivati risultati non reattivi per l'HCV RNA mediante tecniche di amplificazione degli acidi nucleici (NAT), utilizzando metodi validati per adeguata specificità e sensibilità. La Farmacopea Europea recepisce questa sollecitazione, introducendo l'obbligatorietà della ricerca HCV RNA su tutti i plasma pool destinati al frazionamento a partire dal 1/7/1999. Vengono emesse linee guida che definiscono i criteri di validazione e stabiliscono le modalità di valutazione dell'adeguatezza delle procedure analitiche di amplificazione genica per la rilevazione quantitativa della presenza del virus HCV.

Anche l'Italia recepisce l'urgenza di adeguare i livelli di sicurezza trasfusionale a quella dei partner europei e dal 1 luglio 1999, a seguito di uno specifico decreto ministeriale, tutti i pool di plasma umano destinati al frazionamento per la produzione di emoderivati devono essere saggiati e risultare negativi per l'HCV RNA mediante tecnica di amplificazione degli acidi nucleici (NAT), con una metodologia validata ed una sensibilità di almeno 100 UI/ml.

Questo provvedimento produceva un diverso livello di sicurezza tra i plasmaderivati commerciali, saggiati obbligatoriamente per l'HCV RNA, e gli emocomponenti labili quali eritrociti, piastrine e plasma fresco congelato che, nei centri trasfusionali, non venivano sottoposti a NAT, creando così un problema etico.

Per superare questo gap e assicurare un pari livello di sicurezza nelle trasfusioni, il Ministero della Sanità ha emanato, il 30 ottobre 2000, la circolare n° 17 "Adeguamento dei livelli di sicurezza trasfusionale in presenza di metodiche atte alle indagini sui costituenti virali per l'HCV", che sancisce la progressiva estensione della tecnologia NAT anche al sangue e agli emocomponenti labili destinati alla terapia trasfusionale. Spetta alle Regioni definire protocolli operativi, al fine di ottenere i massimi livelli di qualità dei risultati a fronte di economicità di gestione.

Vengono concesse dal Ministero proroghe fino a Maggio 2002, per consentire il progressivo adeguamento strutturale ed organizzativo dei Servizi Trasfusionali, che si trovano di fronte a diverse problematiche:

- costi: studi di fattibilità dimostravano infatti che tale metodologia era economicamente vantaggiosa per un numero di donazioni non inferiore a 30.000/anno, mentre in Italia il 75% delle strutture trasfusionali raccoglie meno di 10.000 unità/anno (ed il 52% circa, meno di 1000 unità/anno);
- personale adeguatamente formato ed in numero sufficiente per far fronte ai nuovi carichi di lavoro;
- ambienti, attrezzature e reagenti idonei;
- organizzazione atta a garantire la rapidità di referenziazione per salvaguardare la tempestiva distribuzione di emocomponenti validati.

Ci si interrogava sull'opportunità di un tale investimento economico e organizzativo a fronte di un aumento della sicurezza fundamentalmente trascurabile.

Ma oltre alla logica dei numeri e del rapporto costi-benefici, andavano considerati gli aspetti tecnico-scientifici, legali e, non ultimi, etici: ad ogni cittadino dobbiamo i più alti livelli di sicurezza possibili; ad ogni cittadino dobbiamo offrire prestazioni che rappresentino il massimo che la conoscenza, la tecnologia, lo stato dell'arte possono offrire.

Inoltre, va sempre considerato che le unità positive, sfuggite ai test anticorpali, potrebbero essere ripartite nei singoli emocomponenti, aumentando il rischio di trasmissibilità e che ogni ricevente può ricevere sangue da donatori diversi (un paziente in terapia trasfusionale è mediamente esposto a prodotti provenienti da 5 donatori diversi).

La biologia molecolare, che era stata appannaggio della ricerca di base in anni in cui sembravano ancora lontane applicazioni in campo diagnostico, entrava addirittura nel campo dei test di screening.

### Il rischio residuo

Le infezioni virali sono una delle complicanze della trasfusione di sangue che più si sono ridotte nel corso degli anni grazie ai test sierologici di screening, in particolare immunoenzimatici, sempre più sensibili e applicati su tutte le unità donate.

Se pur drasticamente ridotto, il rischio di infezioni HIV, HBV, HCV associate alla trasfusione non è scomparso ed è rappresentato dalle donazioni di sangue di donatori sieronegativi durante il periodo "finestra", che costituisce la fase viremica precedente alla sieroconversione (Tabella I).

**Tabella I.** Riduzione della fase di finestra diagnostica con i test NAT.

	TEST EIA	TEST NAT
HIV	22 gg	11 gg
HBV	56 gg	31 gg
HCV	70 gg	12 gg

Si definisce quindi come "rischio residuo" la probabilità che un'unità di sangue, validata perché risultata idonea alla trasfusione, possa comunque trasmettere infezione, in assenza di marcatori specifici rilevabili con gli usuali test di screening.

Il rischio residuo, espresso come numero di unità infette per numero di unità donate (modelli matematici proposti da Lackritz et al. e da Schreiber et al.), è dato dal prodotto della fase finestra del virus considerato, espressa in frazioni di anno, per l'incidence rate.

L' "incidence rate" misura l'incidenza di nuove infezioni in una popolazione a rischio (nuovi casi / n° di persone nei quali si sono determinati ed è generalmente espresso come "casi su un milione"). Il "prevalence rate" misura invece la percentuale di dona-

zioni risultate positive ai test di screening (vecchie e nuove infezioni) e di conferma, nella popolazione in un dato tempo (n° di malati o portatori / n° di persone nei quali sono stati riscontrati).

Il modo più diretto per quantificare il rischio infettivologico residuo è quello di studiare prospetticamente l'incidenza di infezioni nei riceventi; i bassi livelli attuali del rischio residuo e l'elevato numero di riceventi da valutare, rende difficile attuare tali studi.

In alternativa, è possibile calcolare il rischio residuo applicando modelli matematici, che combinano l'incidenza delle sier conversionsi nei donatori con le stime della probabilità che un donatore doni nel periodo "finestra" dei test diagnostici.

E' sempre possibile che bassi livelli di replicazione virale non siano rilevati nemmeno dal test NAT, pur rendendo infetto il sangue.

Bisogna anche considerare che la somministrazione di un emocomponente infetto non significa necessariamente che il ricevente svilupperà l'infezione.

Un'altra importante variabile è la crescita esponenziale della concentrazione virale durante la fase finestra.

Si comprende come le problematiche siano rilevanti e spazino in diversi ambiti: carica virale, volume di emocomponente trasfuso, sensibilità del sistema NAT adottato, grandezza del pool analizzato.

Anche se indubbiamente più limitato rispetto a quanto determinato nel passato dall'introduzione dei test di screening EIA, il vantaggio che le tecnologie NAT sono in grado di apportare alla sicurezza trasfusionale è significativo soprattutto per l'HCV, che raggiunge una concentrazione virale alta nel plasma durante la lunga fase finestra, oggi ridotta di oltre l'80%.

E' ragionevole ipotizzare, per gli studi fin qui condotti da diversi Paesi ed in base all'evidente riduzio-

ne della fase di finestra diagnostica con l'applicazione dei test NAT, una marcata riduzione del rischio residuo (Tabella II).

Le stime del rischio residuo per l'HBV DNA devono essere valutate con molta cautela. L'HBV rimane sempre il virus maggiormente trasmissibile, anche se i NAT lo rilevano 15 giorni prima rispetto ai test di screening.

Il massimo picco della viremia è raggiunto in un tempo di replicazione più lento (2.6-2.8 giorni) di quelli riportati per l'HIV (20.5-22 ore) o per l'HCV (14.9-17 ore).

Durante la fase finestra il virus raggiunge basse concentrazioni; come per l'HBsAg, anche il NAT screening in minipool può non rilevare una concentrazione virale molto bassa. Per la determinazione dei test HBV DNA sono pertanto preferibili quelli su singola unità, la cui applicazione nello screening ha oggi limiti organizzativi ed economici.

Secondo i dati pubblicati da W. K. Roth, il NAT per l'HBV incrementa comunque la sicurezza: dallo screening di 3,6 milioni di donazioni sono state rilevati 6 campioni HBV DNA positivi e HBsAg nega-

Figura 1

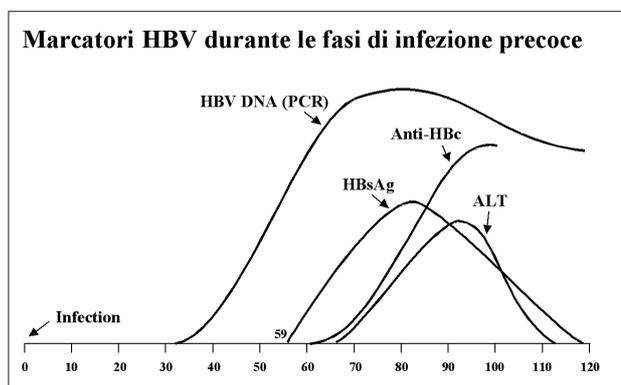
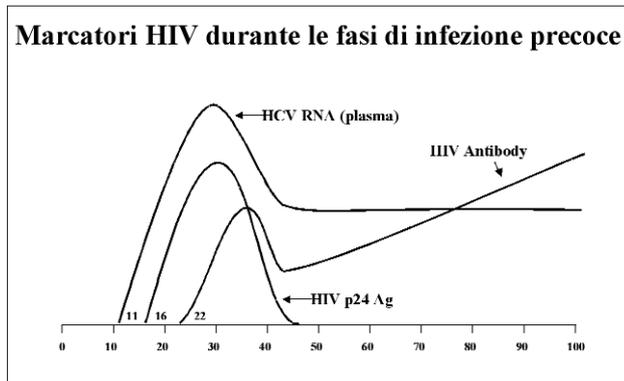


Tabella II. Stime del rischio residuo prima e dopo l'introduzione dei test NAT (S. Glynn, S. Kleinman et al., Transfusion 2002, vol., 42 p.966-72).

Nazione	Rischio residuo test sierologici			Rischio residuo test NAT		
	HIV	HCV	HBV	HIV	HCV	HBV
<b>USA</b> (2000-2001)	1 : 1.429.000	1 : 278.000	1 : 204.000	1 : 2.000.000 ( - 28,55 %)	1 : 2.000.000 ( - 86,10 %)	1 : 250.000 ( - 18,40 %)
<b>Francia</b>	1 : 1.428.000	1 : 760.000	1 : 476.000	1 : 2.500.000 ( - 42,88 %)	1 : 5.000.000 ( - 84,80 %)	1 : 555.000 ( - 14,24 %)
<b>Italia</b>	1 : 435.000	1 : 127.000	1 : 90.909	1 : 900.000 ( - 51,67 %)	1 : 769.000 ( - 83,49 %)	—
<b>Spagna</b>	1 : 526.000	1 : 149.000	1 : 74.000	1 : 1.000.000 ( - 47,40 %)	1 : 1.430.000 ( - 89,59 %)	1 : 128.000 ( - 42,19 %)
<b>Europa centrale</b>	1 : 2.500.000	1 : 238.000	1 : 398.499	1 : 5.000.000 ( - 50 %)	1 : 2.500.000 ( - 90,48 %)	—
<b>Australia</b>	1 : 3.300.000	1 : 118.000	1 : 520.000	1 : 5.000.000 ( - 34 %)	1 : 1.100.000 ( - 89,28 %)	1 : 660.000 ( - 21,22 %)
	Percentuale media di riduzione			- 42,42 %	- 86,29 %	- 24,02 %

Figura 2



tivi; 2 campioni erano di donatori infetti che non avevano sierconvertito e 4 da donatori anti HBc-positivi con bassi livelli di carriers HBV, comunque rilevati dal test NAT.

Per l'HIV RNA va considerato che la fase finestra si riduce del 50% rispetto alla comparsa degli anticorpi, ma molto meno rispetto alla determinazione dell'antigene p24, rilevabile precocemente.

G. Aprili, G. Gandini et al., riportano (Transfusion 2003, vol. 43, p. 848) un caso di infezione acuta HIV-1 in un donatore, rilevata dal test NAT durante il periodo di pre-sieroconversione: il test HIV-1 p24 era ancora negativo 10 giorni dopo la positività HIV RNA. La comparsa degli anticorpi è stata documentata 41 giorni dopo la donazione.

Su oltre 26 milioni di donazioni testate in Nord America sono stati rilevati 6 HIV NAT reattivi p24 negativi (1/4.390.000)

Il test NAT può quindi rilevare HIV-1 RNA unità negative non solo alla ricerca anticorpale ma anche all'antigene p24 la cui determinazione, in aggiunta al test NAT, appare oggi superflua.

### L'introduzione dei test NAT

L'implementazione dei test NAT è avvenuta con tempistiche differenti nei vari Paesi, in base a valutazioni di vari fattori quali l'endemia del virus, le risorse disponibili e l'analisi dei costi-benefici tramite studi di fattibilità.

Solo alcuni Paesi hanno introdotto obbligatoriamente non solo il test HCV RNA ma anche il test HIV RNA.

In Italia, l'Istituto Superiore di Sanità ha affidato lo studio di fattibilità ad un gruppo di lavoro interno al Comitato Tecnico Scientifico; sono stati individuati il Dipartimento Trasfusionale AVIS dell'Azienda Ospedaliera OIRM S. Anna di Torino ed il Centro Nazionale Trasfusione Sangue della Croce Rossa di Roma.

Uno studio di fattibilità è stato promosso nel marzo 2000 anche dalla Commissione Tecnico-Scientifica della Lombardia.

I programmi di studio hanno previsto l'uso di due tecnologie per l'HCV RNA: Transcription-Mediated Amplification (TMA) e Polymerase Chain Reaction (PCR).

La tecnologia TMA è caratterizzata dalle seguenti fasi:

- 1) target capture system (TCS): un sistema a cattura magnetica degli acidi nucleici sfruttando microparticelle
- 2) transcription mediated amplification (TMA): in questa fase, dopo una retrotrascrizione RNA/DNA si verifica una fisiologica trascrizione del DNA in m RNA grazie alla RNAP fino ad ottenere milioni di copie di regioni target dell'acido nucleico
- 3) hybridization protection assay (HPA): permette di rilevare selettivamente i prodotti amplificati
- 4) dual kinetic assay (DKA): rileva due differenti analiti nello stesso campione
- 5) chemiluminescent detection

Nella tecnica di reazione polimerasica PCR una determinata sequenza di nucleotidi bersaglio viene amplificata N volte fino a consentire l'identificazione.

Il test può essere condotto su singolo campione o su minipool e prevede cinque fasi:

- 1) preparazione dei campioni
- 2) trascrizione inversa dell'RNA per generare DNA complementare (cDNA)
- 3) amplificazione del target cDNA usando primers specifici
- 4) ibridazione dei prodotti amplificati a probes oligonucleotidici specifici
- 5) rilevazione tramite determinazione colorimetrica.

La fase di amplificazione e rilevazione della molecola bersaglio è completamente automatizzata.

Ad ogni campione da testare viene aggiunto un controllo interno che assicura il corretto svolgimento delle diverse fasi analitiche. L'automazione assicura alta specificità, efficienza riduzione di campioni non validi o falsi negativi e consente la standardizzazione della metodologia.

Gli standard di riferimento consentono di riportare i risultati in UI/ml.

I risultati degli studi di fattibilità hanno suggerito un approccio organizzativo su più fronti:

- integrazione ed adeguamento di locali e dotazioni strumentali, prevedendo anche apparecchiature di back up
- reagenti validati
- razionalizzazione delle prestazioni nel contesto territoriale, per abbassare i costi ottimizzando le sedute analitiche, garantendo al contempo qualità e standardizzazione
- training adeguato di personale esclusivamente dedicato a questa attività (minimo 2 operatori ogni 20.000 unità/anno)

- appropriata organizzazione della raccolta e del trasporto, con un'accurata definizione della tempistica relativa all'invio dei campioni e alla trasmissione dei referti
- metodologie applicate su piccoli pool.

Le tecnologie attualmente impiegate non hanno un rendimento sufficiente per testare unità individuali ad un costo ragionevole; tuttavia, l'elevata sensibilità dei test attualmente disponibili ne permette l'impiego in pool costituiti da un numero variabile (ad es., 10-16-24) di aliquote di plasma provenienti da singole donazioni, consentendo un contenimento dei costi grazie alla riduzione dei test da eseguire.

L'uso dei pool presenta anche il vantaggio di diluire sostanze inibitrici eventualmente presenti nel singolo campione, limitando il rischio di risultati falsamente negativi ma costituisce pure un punto critico dell'intero processo, da presidiare limitando le procedure manuali e adottando procedure che preven- gano errori e semplifichino il processo stesso, aggiungendo accuratezza e garantendo tracciabilità dei campioni nella preparazione del pool.

La diluizione del singolo campione in pool di ridotte dimensioni non sembra costituire un limite alla rilevazione di HCV RNA, tanto più che nella produzione di plasmaderivati la metodologia prevede un pre-screening con l'analisi di maxipool (ad es., di 420-512 o oltre); i maxipool vengono preparati con una procedura che consente, attraverso la composizione di pool più ridotti, di individuare la donazione responsabile dell'eventuale positività, risalendo poi al singolo campione sul quale viene eseguito il test di conferma.

Il campione individuato può essere poi sottoposto a ulteriori indagini di biologia molecolare quali-quantitative, per definirne la carica ed il genotipo.

Nei servizi trasfusionali non sembra praticabile il ricorso ai maxi pool: in caso di un pool reattivo, si finirebbe per mantenere indisponibili numerose unità di sangue, quando è cruciale poter analizzare un numero di campioni sufficientemente elevato in tempi compatibili alle esigenze di distribuzione degli emocomponenti labili.

Ovviamente, ogni struttura trasfusionale adotta la tecnologia più consona ai propri carichi di lavoro, alle risorse professionali, strumentali e ambientali, nonché alle esigenze da soddisfare nel contesto territoriale di appartenenza.

L'aggregazione territoriale dei SIMT in Dipartimenti di Medicina Trasfusionale, introdotta qualche anno fa in alcune Regioni e adottata dall'ultimo Piano Nazionale Sangue e Plasma, viene indicata come il modello di razionalizzazione delle attività trasfusionali e può diventare contestualmente il sistema di centralizzazione dello screening HCV RNA, in modo da contenere gli investimenti necessari.

Valutazioni effettuate in alcuni dipartimenti trasfu-

sionali regionali che per primi hanno saputo adeguare la propria organizzazione hanno dimostrato che i tempi di validazione delle singole unità non hanno subito modificazioni significative rispetto al precedente svolgimento dell'attività trasfusionale.

I dati preliminari raccolti dai centri che per primi hanno introdotto, come richiesto dalla legge, l'HCV RNA tra i test obbligatori per la validazione delle unità di sangue dimostrano che anche in strutture di medie dimensioni (circa 13.000 donazioni annue) i costi, sebbene alti, variano modestamente e sono prevalentemente legati alla sola acquisizione di strumentazioni e reattivi, a condizione che si riesca realmente a ottimizzare l'organizzazione.

Diverse Regioni hanno comunque già provveduto a revisionare le tariffe del sangue.

Maggiori vantaggi, organizzativi ed economici, sono possibili anche attraverso l'utilizzo di test che consentono la contemporanea rilevazione sia dell'HCV RNA che dell'HIV-1 RNA.

La Japanese Red Cross Transfusion Services ha eseguito lo screening NAT dal 1 Febbraio 2000 al 30 Aprile 2001 su 6.805.010 unità sierologicamente negative usando un multiplex HBV/HCV/HIV-1.

La tabella III riporta alcuni tra i primi dati pubblicati.

**Tabella III.** Casi di NAT + con test di screening negativi, rispetto a donazioni testate.

Paese	Unità testate	HCV	HBV	HIV
Svizzera (Stolz, 2003)	839.056	1		
Italia (SIMTI, 2002)	829.855	3		
Olanda (Cuypers, 2002)	1.800.000	0		
UK (Simmonds, 2002)	7.000.000	3		
Francia (Assal, 2003)	2.500.000	1		1
Spagna (Hernandez, 2002)	803.249	2		
Germania (Roth, 2002)	1.425.000	3	2	1
Centro-Europa: Germania, Austria, Lussemburgo (Roth, 2002)	3.600.000	6	6	2
Giappone (Ohnuma, 2001)	6.805.010	25	112	4
USA (Stramer, 2000)	16.300.000	62		4

### Quale futuro?

C'è ancora molto da fare per perfezionare l'applicazione dei test di amplificazione degli acidi nucleici:

standardizzare le procedure, definire appropriati ed efficaci controlli di qualità, adeguare organizzazione e automazione.

Il futuro vedrà probabilmente i test NAT, resi più economici, sensibili, affidabili, automatizzabili ed in grado di rilevare più patogeni contemporaneamente, rimpiazzare del tutto i test sierologici di screening. Ma questo avrà un senso se verranno superate le difformità tra Paesi: oggi, su 75 milioni di unità annue raccolte, 13 milioni non sono ancora completamente testate nemmeno con i test sierologici di screening.

La biologia molecolare oggi appare come una metodologia trasversale a tutti i settori laboratoristici che ha varcato i confini della ricerca biomedica per entrare in quelli della diagnostica applicata e di screening, mantenendo al contempo le sue enormi potenzialità che consentono non solo di identificare agenti patogeni, noti (ad es., Parvovirus B19 e HAV) e resistenti all'inattivazione o non ancora identificati, ma di quantizzarli e tipizzarli, studiarne le mutazioni, valutarne l'andamento epidemiologico.

Come già accaduto in passato con altre importanti tappe della rapida evoluzione tecnologica e scientifica dei laboratori nelle loro diverse specializzazioni, anche la biologia molecolare dovrà vedere ogni professione laboratoristica preparata culturalmente e tecnicamente a gestirla e sfruttarla nel modo più efficace.

## Bibliografia

1. Miceli M, Iudicone P. "Valutazione organizzativa ed economica per l'applicazione del test NAT-HCV alla validazione degli emocomponenti". *EsaDia* 2001, 40-3.
2. Ghiazza P. "Studio di fattibilità dell'ISS per l'applicazione del NAT: esperienza dell'AVIS di Torino", *EsaDia* 2001, 30-9.
3. Glynn SA, Kleinman SH, Wright DJ, Busch MP. International application of the Incidence Rate/Window Period model, *Transfusion* 2002. 42: 966-72.
4. Velati C, Romano L, Baruffi L, Pappalettera M, Carreri V, Zanetti R. Residual risk of transfusion-transmitted viral HCV and HIV infections by antibody-screened blood in Italy. *Transfusion* 2002. 42: 989-93.
5. Roth WK, Weber M, Buhr S, Drosten C, Weichert W, Sireis W, et al. Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe, *Transfusion* 2002. 42: 862-8.
6. Alvarez M, Oyonarte S, Rodriguez PM, Hernandez JM. Estimated risk of transfusion-transmitted viral infections in Spain, *Transfusion* 2002. 42: 994-7.
7. Tabor E, Epstein JS. NAT screening of blood and plasma donations: evolution of technology and regulatory policy, *Transfusion* 2002. 42: 1230-6.
8. Ohnuma H, Tanaka T, Yoshikawa A, Murokawa H, Minegishi K, Yamanaka R et al. 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 significance of NAT for HBV, *Microbiol Immunol* 2001. 45(9):667-72.
9. Dodd RY, Notari EP, 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: 966-72.
10. Pillonel J, Laperche S, Saura C, Desenclos JC, Couroucé A. Trends in residual risk of transfusion-transmitted viral infections in France between 1992 and 2000, *Transfusion* 2002. 42: 980-8.