

La trasfusione del sangue

Volume 43, Numero 5, Settembre - Ottobre 1998

EDITORIALE

Rischio residuo da trasfusione alla fine degli anni novanta

Giuseppe de Stasio

Azienda Ospedaliera "Di Venere - Giovanni XXIII" - Bari
Servizio di Immunoematologia e trasfusione

L'impiego della terapia trasfusionale è cresciuto ampiamente negli ultimi anni, grazie anche alla aumentata disponibilità di sangue e alla facilità con cui si esegue una trasfusione. Analogamente, la sicurezza trasfusionale è cresciuta nettamente rispetto al passato, ma sequele di tipo infettivo, immunologico, metabolico, ecc. rappresentano ancora oggi un rischio basso ma reale, purtroppo a volte sottostimato dal clinico.

Le complicanze infettive sono in rapporto con la infusione di sangue o emocomponenti contaminati da microorganismi di tipo virale, batterico, protozoi¹⁰, ma anche emocomponenti non contaminati possono predisporre il ricevente a complicanze infettive, a causa dell'effetto immunosoppressivo delle trasfusioni^{15,18}. La contaminazione batterica degli emocomponenti si è sensibilmente ridotta dopo l'introduzione dei contenitori di plastica che ha permesso la loro separazione dal sangue in condizioni di asepsi.

Ciononostante, la crescita batterica è un evento che si verifica nello 0,3-0,4% dei casi, con complicanze trasfusionali gravi, talora mortali⁴. L'attività del complemento, con l'ausilio o meno di anticorpi opsonizzanti, l'attività fagocitica dei leucociti, nonché le condizioni di conservazione a freddo che ostacolano la crescita batterica, sono i meccanismi principali con cui il sangue si mantiene sterile dopo la raccolta.

Studi recenti sulle sepsi batteriche associate a trasfusione hanno messo in evidenza che le specie batteriche implicate sono differenti a seconda che si tratti di concentrati eritrocitari o piastrinici. La *Yersinia enterocolitica* è la causa della metà dei casi associati a trasfusioni di eritrociti e di un solo caso associato a trasfusioni piastriniche¹⁴. Nelle trasfusioni piastriniche prevalgono gli stafilococchi, seguiti da *Salmonelle*, *Serratie*, e streptococchi.

La *Yersinia* cresce in ambiente ricco di ferro, qual'è quello dei concentrati di emazie dopo 3 settimane di conservazione, a causa dell'emolisi che è intervenuta. Purtroppo, la contaminazione non produce alterazioni evidenti dell'unità di sangue. Questa complicanza settica della trasfusione è, comunque, un evento raro, il cui rischio è stimato tra 1/1milione e 1/9milioni di trasfusioni di eritrociti¹⁴.

Per prevenire la trasfusione di piastrine contaminate si è pensato di attivare uno screening batteriologico di tutti i concentrati piastrinici preparati a circuito aperto e di quelli conservati per oltre 48 ore. Sia l'esame colturale che la colorazione di Gram sono metodi inadeguati per lo screening delle unità contaminate. La sensibilità della colorazione di Gram è bassa, e richiede circa

100.000 CFU (Colony-forming unit)/mL³. Sono necessari metodi più sensibili e più specifici per lo screening generalizzato della contaminazione batterica. È stato proposto un test che fa uso di una sonda di DNA chemiluminescente per rilevare tutti i batteri clinicamente significativi nei preparati ematici. La sonda di DNA marcata è diretta verso una regione altamente conservata dell'RNA ribosomico. Il test è in grado di rilevare la contaminazione batterica nel 100% dei preparati piastrinici con 500.000 CFU/mL e nell'80% di quelli con 1000/10.000 CFU/mL¹³.

La sifilide associata a trasfusione è un rischio trascurabile della moderna terapia trasfusionale. Le ragioni della rarità della sifilide trasmessa con la trasfusione non sono completamente note.

Potrebbero essere in causa la rarità della spirochetemia, la fragilità del microorganismo durante la conservazione a freddo o le procedure di screening sui donatori. Studi, anche se limitati, dimostrano che le spirochete della sifilide non sopravvivono nei concentrati eritrocitari, ma non v'è alcuno studio riferito ai concentrati piastrinici, nei quali potrebbero sopravvivere più a lungo.

V'è una significativa correlazione fra sieroprevalenza dei test sierologici per la diagnosi della sifilide e sieroprevalenza dell'infezione da HIV, HBV e HCV, sia nei gruppi di soggetti ad alto rischio che nei donatori volontari⁶. Gli attuali saggi di screening hanno sensibilità molto diversa. I saggi di screening per la sierodiagnosi della lue hanno qualche valore come test surrogati per le infezioni da HIV, HBV e HCV, ma il costo di queste indagini si giustifica probabilmente solo nei paesi o nelle popolazioni con un rischio significativo di infezione da HIV trasmessa per via eterosessuale o di altre infezioni a trasmissione sessuale.

Tra le malattie protozoarie, il rischio di **malaria** nel ricevente è particolarmente grave per il fatto che i medici che operano nelle aree non endemiche non hanno consuetudine con la malattia. La diagnosi è spesso difficile, non solo per il periodo di incubazione variabile, ma anche per la sintomatologia non specifica. In genere, nei casi osservati sono in causa una raccolta poco accurata dell'anamnesi del donatore e l'inosservanza di norme precise per il rinvio di donatori che hanno soggiornato in zone endemiche, o di donatori residenti o immigrati da zone malariche. Il rischio di malaria post-trasfusionale nei paesi non endemici è di 0,25% casi per milione di unità di sangue trasfuse²⁰.

Il miglioramento dei saggi di screening ha progressivamente ridotto la finestra sierologica di negatività nel donatore di sangue, portando il rischio di trasmissione di malattie infettive virali con la trasfusione di sangue a livelli estremamente bassi. Il limite di sensibilità dei saggi immunoenzimatici correnti non è adeguato a prevenire in ogni caso la trasmissione di virus nei riceventi. Per esempio, il limite di sensibilità per le particelle di HBsAg, il marcatore del virus B dell'epatite (HBV), è di circa 100-200 pg/mL, che corrisponde a circa 30 milioni di particelle virali per millilitro.

Il **virus dell'epatite B (HBV)** continua ad essere una causa significativa di epatite post-trasfusionale, nonostante l'introduzione di saggi di screening. Individui infetti con livelli di HBsAg inferiori alla soglia di sensibilità del metodo non sono svelati con i saggi correnti. Una riprova di quanto detto viene offerta dalla osservazione che nonostante lo screening HBsAg dei donatori,

molti emofilici che hanno ricevuto concentrati di fattore VIII non termo-trattati presentano marcatori di infezione HBV.

In Italia, l'incidenza (tassi per milione) dei casi notificati di epatite B e non-A, non-B con storia di trasfusione di sangue, è passata rispettivamente da 1,4 e 4,4 nel 1987 a 0,4 e 0,1 nel 1994. In molti dei casi notificati, comunque, la trasfusione non era l'unico fattore di rischio.

Alcuni donatori portatori di mutanti dell'HBV possono essere negativi alla ricerca dell'HBsAg. In questi casi sono in gioco mutanti dell'epitopo "a" dell'antigene di superficie che compaiono grazie alla pressione selettiva degli anticorpi anti-HBs, sia indotti dal vaccino^{21,24} che somministrati terapeuticamente¹⁷. Nella maggior parte dei casi, v'è una mutazione puntiforme dell'HBV, da guanosina ad adenosina nella posizione 587, che si traduce in una sostituzione della glicina con arginina nell'aminoacido 145 dell'HBsAg, all'interno dell'epitopo "a". Sono state descritte alcune varianti arginina 145 che reagiscono solo con anticorpi policlonali^{7,16}. La mancata individuazione dell'HBsAg con i kit correnti può spiegare alcuni casi di trasmissione del virus con la trasfusione di sangue.

Secondo alcuni Autori¹⁹, lo screening anti-HBc potrebbe prevenire dal 33 al 50% dei casi di epatite trasmessi con la trasfusione di sangue. La questione è molto controversa; un nostro studio tende ad escludere un valore predittivo positivo a questa indagine^{10bis}.

Il modo più diretto per quantificare il **rischio infettivologico residuo** è quello di studiare prospetticamente l'incidenza di infezioni nel ricevente, ma oggi è difficile condurre tali studi in considerazione dei livelli estremamente bassi dell'attuale rischio residuo e del numero molto elevato di riceventi da valutare. Alternativamente, per l'infezione da HIV l'incidenza di infezioni può essere calcolata con saggi più sensibili, quali la ricerca degli acidi nucleici (mediante amplificazione del DNA con PCR) o la ricerca di antigeni virali (antigene p24 dell'HIV). Questo tipo di studi è, comunque, dispendioso e può rilevare solo una piccola quota delle unità infette, data la insufficiente sensibilità dei saggi diretti di ricerca virale.

L'insidia maggiore della sicurezza trasfusionale è rappresentata dalla donazione di sangue di donatori sieronegativi durante il periodo "finestra", che è la fase viremica pre-sieroconversione. Combinando l'incidenza delle sieroconversioni nei donatori con le stime delle probabilità che un donatore doni nel periodo "finestra", è possibile calcolare in modo sufficientemente accurato il rischio residuo. Calcolando le frequenze di sieroconversioni tra i donatori di sangue che avevano donato più di una volta nei due anni precedenti e che erano risultati sieronegativi alle indagini di routine, e aggiustando queste frequenze per la durata dei periodi finestra di ciascun virus, alcuni Autori hanno recentemente quantificato i rischi residui per ciascuno dei 4 maggiori virus veicolati dal sangue, HIV, HBV, HCV e HTLV²².

Il rischio attuale di donare sangue durante il periodo finestra è stato così determinato:

- per HIV-1, 1/493.000 (95% intervallo di confidenza, da 202.000 a 2.278.000)
- per HTLV-1, 1/641.000 (95% IC, da 256.000 a 2.000.000)
- per HCV, 1/103.000 ((95% IC, da 28.000 a 288.000)
- per HBV 1/63.000 (95% IC, da 31.000 a 147.000).

L'introduzione di nuovi e più sensibili saggi di screening, quali la ricerca degli acidi nucleici virali o di antigeni virali, potrebbe ridurre ulteriormente i rischi del 27-72%.

Nella valutazione di questi dati non si è tenuto conto dell'incidenza di sier conversionsi fra i primidonatori, ma la loro frequenza nello studio considerato era solo del 20%. Questi dati risentono della precisione delle stime dei periodi finestra e dell'incidenza delle infezioni nei donatori. Purtroppo, in questi studi non si può tener conto del possibile contributo dei casi di infezione cronica senza sieropositività rilevabile, cosa che, per quanto riguarda le infezioni da HCV acquisite in comunità, può rappresentare un 10% delle infezioni totali²².

Pur considerando i limiti di queste stime, che risentono della prevalenza di una particolare infezione virale e del periodo preso in esame, è evidente che il miglioramento dei saggi sierologici di screening ha progressivamente ridotto la finestra sierologica di negatività per quanto riguarda la prevenzione delle malattie virali trasmissibili con il sangue.

In Italia, lo studio "Cooley-Care", condotto su oltre 1.500 pazienti affetti da talassemia major che avevano trasfuso 245.000 unità nel periodo 1993-1996²³, ha permesso di documentare un rischio residuo di:

- per HIV-1, 1/245.000
- per HTLV-1, 1/640.000
- per HBV, 1/63.000
- per HCV, 1/8000

Nei donatori di sangue, la ricerca diretta dei virus con tecniche di biologia molecolare (PCR) potrebbe ridurre la finestra sierologica di alcuni giorni. Studi recenti hanno stabilito che l'HIV DNA associato alla cellula e l'HIV RNA libero sono rilevabili rispettivamente 1 e 2 settimane prima della comparsa degli anticorpi anti-HIV.

Oggi problemi tecnici ed economici impediscono l'introduzione dei saggi di amplificazione genica nello screening delle donazioni. I problemi tecnici riguardano la sensibilità ancora non molto elevata della PCR (in 450 µL di sangue da 45.000 a 450.000 copie di genomi possono non essere rilevate)², e la mancanza di correlazione tra attività in PCR ed infettività dei virus nelle culture cellulari⁹. Se la dimostrazione mediante PCR della presenza del genoma virale può essere considerata una prova di potenziale infettività, la negatività alla PCR non esclude l'infettività. Infatti, una viremia di basso livello o una diversità genetica dei ceppi virali possono portare ad una PCR falsamente negativa. In alcuni pazienti poi, il tempo in cui viene effettuato il prelievo per la ricerca è estremamente importante per il risultato. Per esempio, in alcuni pazienti emofilici è stato dimostrato che la viremia HCV è intermittente¹². La conservazione dei campioni, inoltre, è un fattore critico. Se non è ottimale, può verificarsi la degradazione del genoma e un risultato falsamente negativo. Questo è soprattutto vero per genomi labili ad RNA, come quello dell'HCV.

Sebbene il problema dei frequenti risultati falsamente positivi dovuto al carryover (contaminazione da trasporto) sia stato ridotto attraverso l'uso di particolari precauzioni tecniche e il ricorso a strategie per la sterilizzazione del prodotto amplificato, i falsi positivi dovuti a livelli minimi di contaminazione crociata possono ancora essere presenti quando si lavora con centinaia o migliaia di campioni al giorno. Nell'ambiente trasfusionale questo problema assume un'importanza particolare, perché con l'uso di campionatori automatici, spesso con sonde lavabili, un "carryover" anche minimo è frequente.

Una possibile soluzione al problema è l'adozione di procedure a sistema chiuso che alcune aziende commerciali stanno sviluppando. Bisogna considerare anche che, mentre il costo della ricerca diretta degli acidi nucleici virali che si aggiungerebbe ai normali saggi di screening sarebbe consistente (diverse decine di miliardi), l'accresciuta sicurezza trasfusionale che ne deriverebbe è

tutta da stabilire. Sono allo studio saggi "multipli" che prevedono la ricerca contemporanea di tutti i virus di interesse trasfusionale, ma ci vorranno 3-5 anni prima che arrivino sul mercato.

Un saggio aggiuntivo di screening dei donatori, per ridurre ulteriormente la finestra dell'HIV, è la ricerca dell'antigenemia p24. Si stima che questo test possa ridurre di 6-10 giorni la finestra sierologica dell'HIV e prevenire del 7-30% la trasmissione del virus con le trasfusioni.

In Italia, ammettendo un rischio di infezione da HIV per via trasfusionale di 1/400.000, si avrebbero 7-8 casi /anno di infezioni, su circa 3 milioni di trasfusioni. Il test per l'antigenemia HIV, introdotto nello screening delle donazioni, ridurrebbe di circa il 25% il numero delle infezioni da "fase finestra"⁵.

Per il nostro Paese significherebbe prevenire circa 1-2 casi per anno di infezione da HIV associata a trasfusione.

Bisognerà attentamente valutare il rapporto costo/benefici di queste nuove strategie preventive che in genere è molto alto. In USA, è stato calcolato che lo screening dell'antigene p24 dovrebbe teoricamente rilevare una donazione infetta ogni 1,6 milioni di unità raccolte, con un costo di circa 50 milioni di dollari (la raccolta è di 12 milioni di unità/anno) e di circa 12.000 donazioni falsamente positive¹.

L'infezione da virus D dell'epatite (HDV) non ha rilevanza clinica, perché la coinfezione con l'HBV è essenziale per la replicazione dell'HDV e con la eliminazione del sangue HBsAg positivo si previene la trasmissione dell'HDV.

I virus A (HAV) ed E (HEV) dell'epatite sono a trasmissione enterica. Si possono osservare viremie asintomatiche transitorie durante il periodo di incubazione, che solo in casi molto rari sono responsabili di episodi di trasmissione ai riceventi di trasfusione¹⁰.

Il Citomegalovirus è responsabile sia di infezioni primarie che di riattivazioni e reinfezioni post-trasfusionali. I pazienti immunosoppressi sviluppano più facilmente una malattia grave, per cui ad essi sono destinati emocomponenti prelevati da donatori sieronegativi o leuco-depleti mediante filtrazione. Le ultime evidenze suggeriscono che i concentrati eritrocitari e piastrinici, leucodepleti mediante filtrazione (riduzione di 3 log₁₀), sono almeno equivalenti agli emocomponenti CMV-sieronegativi nella prevenzione delle infezioni trasmesse con la trasfusione. Alcuni dati recenti, poi, documentano l'RNA del CMV nei leucociti periferici di pazienti che sono anticorpo-negativi²⁵; pertanto, la leucodeplezione può rappresentare la scelta migliore per fornire emocomponenti non a rischio di trasmissione del CMV.

Il virus di Epstein-Barr non sembra causare malattie post-trasfusionali significative.

Tra le infezioni virali emergenti osserviamo che la trasmissibilità dell'HGV (Hepatitis G Virus) è stata dimostrata da studi sequenziali in casi di epatite post-trasfusionale, ma l'importanza di questo nuovo agente etiologico come causa di malattie epatiche e croniche non è ancora provata. Data l'elevata prevalenza dell'HGV e la sua associazione con forme clinicamente lievi o con nessuna malattia, è possibile che si tratti di un passeggero occasionale che viaggia con virus nonA-E non ancora identificati.

L'HHV-8 (Human Herpesvirus 8), un nuovo virus erpetico umano presente nella popolazione normale, sembra avere un ruolo potenziale nei linfomi e nel sarcoma di Kaposi. Recentemente isolato anche da un donatore di sangue normale, pone il problema della possibilità teorica di trasmissione di un genoma latente con successiva attivazione nel ricevente di sangue. L'immunomodulazione indotta dalla trasfusione potrebbe essere permissiva per un sarcoma di Kaposi quando emocomponenti HHV-8positivi vengono infusi nel ricevente.

L'SV40 (Simian Polyomavirus 40), introdotto nella popolazione umana circa 40 anni fa con i vaccini polio contaminati, è considerato un possibile cofattore nella etiopatogenesi di tumori cerebrali nell'uomo. La sua dimostrata diffusione per via orizzontale nella popolazione potrebbe costituire una potenziale nuova insidia della trasfusione.

Per quanto riguarda i **plasmaderivati** negli ultimi dieci anni la loro sicurezza e purezza sono migliorate enormemente. Ottenuti da grandi pool di plasma (fino a 20.000 donazioni), prima dell'applicazione di tecniche di inattivazione virale sono quasi universalmente contaminati con virus patogeni. La selezione accurata dei donatori, però, e lo screening di ogni donazione hanno fatto sì che i pool di plasma utilizzati per la loro produzione contengano livelli molto bassi di virus infettanti. I saggi sui pool di plasma hanno un valore limitato nell'assicurare la sicurezza dei plasmaderivati. Ciononostante, nella Comunità europea tutti i pool debbono essere testati per l'HBsAg, l'anti-HIV e l'anti-HCV11. Con la sensibilità attuale dei saggi correnti, una singola donazione positiva per l'HBsAg e anti-HIV può essere rilevata in un pool di 5.000-20.000 donatori, mentre vi sono scarse possibilità di rilevare una singola donazione anti-HCV positiva sfuggita allo screening. Per questo motivo, i produttori sono stati invitati a considerare la possibilità di testare i pool con la PCR8.

I prodotti albuminoidei sono universalmente considerati completamente privi del rischio di trasmissione virale, perché la pastorizzazione cui sono sottoposti allo stato liquido inattiva un ampio spettro di virus.

Il trattamento con solvente/detergente è molto efficace nell'eliminare la trasmissione dei virus con capsula lipidica quali l'HIV, l'HBV e l'HCV, mentre è inefficace contro i virus non incapsulati come l'HAV e il Parvovirus B19.

Fortunatamente, con questi due virus il rischio di conseguenze gravi nel ricevente è estremamente basso. La pastorizzazione è preferibile all'inattivazione con i metodi solvente/detergente o cromatografia a scambio ionico. I concentrati in corso di produzione già prevedono una specifica fase di inattivazione dei virus senza capsula quali l'HAV e il B19.

In conclusione, si può dire che, alla fine degli anni novanta, il rischio infettivo residuo da trasfusione di sangue ed emocomponenti è estremamente basso e suscettibile di essere ulteriormente ridotto. La quantificazione del rischio è resa difficile e dispendiosa dalla bassa incidenza di infezioni nella popolazione dei pazienti trasfusi. Un rischio nullo nella trasfusione di sangue è, comunque, virtualmente irraggiungibile.

Per quanto riguarda la sicurezza dei plasma-derivati, tutti i problemi connessi sono stati identificati, per cui c'è la fondata speranza che nei prossimi anni il rischio di trasmettere un agente virale con questi prodotti sarà quasi nullo.

Bibliografia

- 1) Alter HJ, Epstein JS, Swenson SG et al.: Prevalence of human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen in U.S. blood donors: an assessment of the efficacy of testing in donor screening. *N Engl J Med*, 323, 1312, 1990.
- 2) Barbara JAJ, Grason JA: Future developments in Transfusion Microbiology: introduction and nucleic acid detection. Proceedings of the ESTM Residential Course on "Detection and Prevention of Transfusion-transmissible Infection". Barbara JAJ, de Stasio G (Coordinators), The Hague, The Netherlands, 8-11 May 1996, pag 101, estm, Milano, 1996.
- 3) Blajchman MA, Ali AM: Bacteria in the blood supply: an overlooked issue in Transfusion Medicine. In: Nance SJ (Ed) *Blood Safety: Current Challenges*. pag. 213. American Association of Blood Banks, Bethesda, MD, 1992.
- 4) Blajchman MA, Ali AM, Richardson HL: Bacterial contamination of cellular blood components. *Vox Sang*, 67,(Suppl.3), 25, 1994.
- 5) Busch MP, Lee LLL, Satten GA et al.: Time course of detection of viral and serological markers preceding HIV-1 seroconversion; implications for blood and tissue donor screening. *Transfusion*, 35, 91, 1995.
- 6) Cable RG: Evaluation of syphilis testing of blood donors. *Transf Med Rev*, 10, 296, 1996.
- 7) Carman W, Thomas H, Domingo E: Viral genetic variation: hepatitis B as a clinical example. *Lancet*, 341, 349, 1993.
- 8) Committee for Proprietary Medicinal Products: Ad Hoc Working Party on Biotechnology/Pharmacy and Working Party on Safety Medicines. EEC Regulatory Document. Note for guidance: Guidelines for medicinal products derived from human blood and plasma. *Biologicals*, 20, 159, 1992.
- 9) Cuthbertson B, Hart H: Safety of pooled plasma products. Proceedings of ESTM Residential Course on "Detection and Prevention of transfusion-transmissible infection". Barbara JAJ, de Stasio G (Coordinators), The Hague, The Netherlands, 8-11 May 1996, pag 101, ESTM, Milano, 1996.
- 10) de Stasio G: Il Rischio Trasfusionale. SIMTI Editore, Milano, 1995. 10bis) de Stasio G, Petio MM, D'Erasmo F et al.: Lo screening sulle donazioni di sangue per prevenire l'infezione da HBV da trasfusione. Atti del corso residenziale ESTM "Sicurezza del sangue e dei suoi prodotti: emovigilanza; indicazioni cliniche alla trasfusione" (Roma, 26-29 giugno 1997) pag. 99, Edizioni ESTM, Milano, 1997.
- 11) European Economic Community (EEC): Ad Hoc Working Party on Biotechnology/Pharmacy. Note for guidance: Plasma pool testing. EEC III/5, 193, 1994.
- 12) Garson JA, Tuke PW, Makris M et al.: Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis-C-virus-contaminated factor VIII concentrates. *Lancet*, 336, 1022, 1990.
- 13) Hogan J, Curry B, Brecher M et al.: Detection of bacterially contaminated platelet units with an all-bacterial DNA probe test. *Transfusion*, 33 (Suppl), S152, 1993.
- 14) Hogman CF, Engstrand L: Factors affecting growth of *Yersinia enterocolitica* in cellular blood products. *Transf Med Rev*, 10, 259, 1996.
- 15) Jensen LS, Andersen AJ, Christiansen et al.: Postoperative infection and natural killer cell function following blood transfusion in patients undergoing elective colorectal surgery. *Br J Surg*, 79, 513, 1992.
- 16) Jongerius JM, van Oostendorp WR, van der Poel CR et al.: HBsAg mutant HBV missed by several HBsAg tests. *Transfusion*, 36(Suppl), 31S, 1996.
- 17) Mc Mahon BJ, Parkinson AJ, Helminiak C et al.: Response to hepatitis B vaccine of persons positive for antibody to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology*, 103, 590, 1992.
- 18) Meryman HT: Transfusion-induced alloimmunization and immunosuppression and the effects of leukocytes depletion. *Transf Med Rev*, 3, 180, 1989.
- 19) Mosley JW, Stevens CE, Aach RD et al.: Donor screening for antibody to hepatitis core antigen and hepatitis B virus infection in transfusion recipients. *Transfusion*, 35, 5, 1995.
- 20) Nahlen BL, Lobel HO, Cannon SE et al.: Reassessment of blood donor selection criteria for United States travelers to malarious areas. *Transfusion*, 31, 798, 1991.
- 21) Okamoto H, Yano K, Nozaki Y et al.: Mutations within the s gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine. *Pediatric Res*, 32, 264, 1992.

- 22) Schreiber GB, Busch MB, Kleinman SH et al.: The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med*, 334, 1685, 1996.
- 23) Zanella A: Comunicazione personale, 1996.
- 24) Zanetti AR, Tanzi E, Manzillo G et al.: Hepatitis B variant in Europe. *Lancet*, 332, 1132, 1988.
- 25) Zhang LJ, Hanff P, Rutherford C et al.: Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis*, 171, 1002, 1995.