

IV

(Informazioni)

INFORMAZIONI PROVENIENTI DALLE ISTITUZIONI, DAGLI ORGANI E
DAGLI ORGANISMI DELL'UNIONE EUROPEA

COMMISSIONE EUROPEA

Nota esplicativa relativa alla riduzione del rischio di trasmissione di agenti di encefalopatie spongiformi animali attraverso medicinali per uso umano o veterinario (EMEA/410/01 rev. 3)

(2011/C 73/01)

Nota relativa alla riduzione del rischio di trasmissione di agenti di encefalopatie spongiformi animali attraverso medicinali per uso umano o veterinario.

La presente terza revisione della nota esplicativa sull'EST (encefalopatia spongiforme trasmissibile) è stata realizzata per rispecchiare il progresso delle conoscenze scientifiche nel campo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili, nonché dell'evoluzione dell'encefalopatia spongiforme bovina (ESB) nelle diverse parti del mondo.

Per la classificazione dei paesi o delle regioni a seconda del rischio di ESB, la nota esplicativa riveduta fa riferimento alle norme predisposte dall'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE), a sostituzione delle precedente classificazione RGE. Tuttavia, per i paesi che sono stati classificati secondo i criteri RGE ma non ancora secondo i criteri OIE, sarà applicabile la classificazione RGE esistente, a condizione che non vi siano evidenti modifiche di rilievo nel rischio di ESB.

Sono stati introdotti nuovi criteri circa l'origine e il trattamento della gelatina e dei derivati di sangue bovino utilizzati nella fabbricazione di medicinali ad uso umano o veterinario, come pure una nuova sottosezione «Peptoni».

Essa sostituisce la precedente nota esplicativa (EMEA/410/01 rev. 2, pubblicata nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* C 24 del 28.1.2004, pag. 6). La data proposta di entrata in vigore della presente nota è il 1° luglio 2011.

1. INTRODUZIONE**1.1. Contesto scientifico**

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono malattie croniche neurodegenerative, caratterizzate dall'accumulo di un'isoforma anormale di una glicoproteina cellulare denominata PrP (o proteina prionica). L'isoforma anormale della PrP (PrP^{EST}) si distingue dalla PrP normale (PrP^c) per la sua elevata resistenza alla proteasi e ai trattamenti di denaturazione termici. La PrP^{EST} è considerata l'agente infettivo responsabile della trasmissione delle EST.

La famiglia delle EST negli animali include:

- l'encefalopatia spongiforme bovina (ESB) dei bovini,
- la scrapie di ovini e caprini,

— la sindrome atrofica cronica (CWD) di odoceli e alci,

— l'encefalopatia trasmissibile del visone nei visoni d'allevamento,

— l'encefalopatia spongiforme felina nei felidi (in particolare nei gatti domestici e nei grandi felini in cattività), e

— l'encefalopatia spongiforme degli ungulati esotici dei parchi zoologici.

Nell'uomo, le encefalopatie spongiformi trasmissibili si manifestano nelle diverse forme della malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ), nel Kuru, nella sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGSS) e nell'Insonnia Fatale Familiare (IFF).

Sono riportati casi di trasmissione iatrogena di encefalopatie spongiformi. Negli ovini, la scrapie è stata accidentalmente trasmessa con l'impiego di un vaccino contro il virus Louping Ill (meningoencefalomielite enzootica), preparato a partire da un mix di cervelli e milze di ovini trattati con formaldeide nei quali era stato inavvertitamente incorporato materiale proveniente da pecore affette da scrapie. Inoltre, la trasmissione di scrapie in ovini e caprini è avvenuta a seguito dell'uso di un vaccino inattivato con formolo contro l'agalassia contagiosa, preparato a partire da cervelli e ghiandole mammarie omogeneizzati di ovini infettati con *Mycoplasma agalactiae*. Per gli esseri umani sono riportati casi di trasmissione della MCJ attribuiti alla ripetuta amministrazione parenterale di ormone della crescita e gonadotropina ricavata da ghiandole pituitarie umane provenienti da cadaveri. Casi di MCJ sono anche stati attribuiti all'impiego di strumenti contaminati nella chirurgia cerebrale e nel trapianto di meningi e cornee umane.

Esistono barriere naturali che limitano la proliferazione dell'infettività tra le specie, ma che possono essere superate in circostanze favorevoli. Ciò dipende dalla specie d'origine, dal ceppo del prione, dalla dose, dal tipo di esposizione e, in talune specie, dall'allele portatore del gene PrP.

L'encefalopatia spongiforme bovina (ESB) è stata diagnosticata per la prima volta nel Regno Unito nel 1986 e ha colpito un numero elevato di capi e di mandrie. L'ESB è chiaramente una malattia di origine alimentare legata ad un'alimentazione a base di farina di carne e d'ossa proveniente da animali colpiti da EST. In altri paesi si sono avuti casi che riguardavano capi di bestiame importati dal Regno Unito o indigeni. Vi sono prove convincenti della tesi che la variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (VMCJ) sia causata dall'agente eziologico responsabile dell'ESB nei bovini. È quindi giustificato che si proceda con cautela quando si impiegano per la fabbricazione di medicinali materiali biologici di specie colpite per via naturale dalle EST. Ciò vale in particolare per materiali provenienti dalla specie bovina.

Nel corso dei programmi di vigilanza attiva, sono stati osservati alcuni casi sporadici in Europa, Nordamerica e Giappone di forme atipiche di ESB finora sconosciute (ESB-L, anche chiamata BASE, e ESB-H). La «L» e la «H» identificano le posizioni elettroforetiche superiori e inferiori delle relative isoforme PrP^{EST} resistenti alla proteasi. È importante osservare che casi atipici sono stati riscontrati in paesi che non avevano finora fatto registrare casi di ESB classica, ad esempio la Svezia, oppure in paesi in cui sono stati accertati soltanto pochi casi di ESB classica, ad esempio il Canada o gli Stati Uniti. Su base sperimentale l'agente ESB atipico è stato trasmesso a topi transgenici esprimenti la proteina prionica umana e a un macaco cino-molgo.

La scrapie è diffusa in tutto il mondo. Essa ha la massima incidenza a Cipro. Gli esseri umani sono naturalmente esposti all'agente eziologico che provoca la scrapie negli ovini da almeno 250 anni, ma non esistono prove epidemiologiche di un

legame diretto tra tale malattia e le encefalopatie spongiformi nell'uomo⁽¹⁾. Tuttavia, permane teoricamente un rischio, al momento non quantificabile, che integratori proteici contaminati da ESB siano stati utilizzati per l'alimentazione di ovini. Inoltre, va ipotizzato che ogni agente eziologico responsabile dell'ESB introdotto nella popolazione di piccoli ruminanti tramite la somministrazione di alimenti contaminati possa essere riciclato e il suo effetto amplificato⁽²⁾.

È interessante infettare cellule con agenti EST al fine di sviluppare dosaggi e per motivi scientifici di base. Sono stati ottenuti alcuni successi, in genere ma non sempre, con linee cellulari neurali. Le condizioni necessarie per infettare una cellula non sono ben note e il processo è difficile, e richiede una particolare combinazione di agente e cellula. Non si ritiene opportuno formulare raccomandazioni specifiche per quanto riguarda substrati di cellule da utilizzare per la produzione di sostanze di origine biologica/biotecnologica. Peraltro, nella valutazione del rischio sarà necessario tener conto della possibilità di infezione di linee cellulari con agenti delle EST.

1.2. *Rispetto della regolamentazione*

Valutazione dei rischi – Dal momento che è inevitabile l'utilizzo di materiali derivati da animali per la produzione di determinati prodotti farmaceutici e che è di rado possibile una completa eliminazione del rischio alla fonte, le misure adottate per gestire il rischio di trasmissione di EST animale tramite prodotti medicinali servono più a contenere al massimo il rischio che non ad eliminarlo. Va pertanto verificato il rispetto delle norme sulla base di una valutazione del rischio, alla luce di tutti i fattori pertinenti identificati nella presente nota esplicativa (cfr. in appresso).

Base giuridica – La presente nota è pubblicata dalla Commissione europea in base:

- all'allegato I, parte I, modulo 3, sezione 3.2: *Contenuto: principi e requisiti fondamentali*, punto 9, della direttiva 2001/83/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 6 novembre 2001, recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano⁽³⁾, nella versione modificata, e
- all'allegato I, titolo I, parte 2, capitolo C: *Produzione e controllo delle materie prime* della direttiva 2001/82/CE, del Parlamento europeo e del Consiglio, del 6 novembre 2001, recante un codice comunitario relativo ai medicinali veterinari⁽⁴⁾, nella versione modificata.

⁽¹⁾ Attualmente in corso di valutazione da parte dell'EFSA e dell'ECDC. Per informazioni aggiornate consultare il link seguente: <http://registrofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsListLoader?mandate=M-2009-0221>

⁽²⁾ Nel gennaio 2005, a seguito della conferma di ESB in una capra in Francia, sono state adottate misure supplementari ed effettuate maggiori prove su piccoli ruminanti. La maggiore sorveglianza non ha fatto rilevare altri casi di ESB presso ovini e caprini nell'UE.

⁽³⁾ GU L 311 del 28.11.2001, pag. 67.

⁽⁴⁾ GU L 311 del 28.11.2001, pag. 1.

In base a tali direttive i richiedenti un'autorizzazione per la messa in commercio di sostanze medicinali per uso umano o veterinario devono dimostrare che tali sostanze sono prodotte compatibilmente con la versione più recente della presente nota pubblicata nella *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*. Tale obbligo permane anche una volta ottenuta l'autorizzazione di immissione sul mercato.

Per definizione, il principio di materiale a rischio specifico, quale definito dal regolamento (CE) n. 999/2001 del Parlamento europeo e del Consiglio⁽⁵⁾, non si applica ai prodotti medicinali. Peraltro, il regolamento (CE) n. 1774/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio⁽⁶⁾, applicabile dal 1° maggio 2003, fissa norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano. In genere, fatte salve adeguate motivazioni, tutti i sottoprodotti animali utilizzati come materie prime nella fabbricazione di medicinali devono appartenere alla categoria 3 (materiali sicuri o equivalenti) secondo la definizione contenuta nel regolamento (CE) n. 1774/2002. L'impiego di sostanze estratte da altri tessuti di elevata infettività deve essere giustificato in funzione di un'appropriata ponderazione dei rischi/benefici (cfr. in appresso).

La presente nota esplicativa va vista in relazione con i diversi atti giuridici dell'UE, segnatamente le decisioni della Commissione attuate progressivamente dal 1991. Laddove necessario, figurano nel testo riferimenti a tali decisioni. I pareri scritti e le note esplicative del comitato permanente per i medicinali per uso umano (CHMP) e del comitato per i medicinali veterinari (CVMP) restano validi agli effetti della conformità alle norme, salvo indicazione contraria della presente nota.

Nella farmacopea europea è inclusa una monografia generale dal titolo: «Prodotti a rischio di trasmissione di agenti di encefalopatie spongiformi animali». Detta monografia, che rimanda a un capitolo generale della farmacopea europea, è identica alla presente nota esplicativa. Sulla base di tale monografia vengono rilasciati certificati di idoneità, che consentono di comprovare la conformità alle norme in materia di EST delle sostanze e dei materiali impiegati nella fabbricazione di prodotti medicinali per uso umano e veterinario.

Chiarimento della nota esplicativa – Dal momento che le conoscenze scientifiche in materia di EST e in particolare della patogenesi delle malattie, sono in continua evoluzione, è possibile che il CHMP e il suo gruppo di lavoro «Biologia», in collaborazione con il CVMP e il suo gruppo di lavoro «Immunologia», debbano ulteriormente mettere a punto linee orientative supplementari sotto forma di pareri scritti o di note esplicative ai fini di un chiarimento della presente nota. Tali orientamenti supplementari saranno pubblicati dalla Commissione e sul sito web dell'Agenzia europea per i medicinali (EMA). Di essi si

⁽⁵⁾ GU L 147 del 31.5.2001, pag. 1.

⁽⁶⁾ GU L 273 del 10.10.2001, pag. 1. Il regolamento (CE) n. 1774/2002 è stato abrogato dal regolamento (CE) n. 1069/2009 applicabile dal 4 marzo 2011 (GU L 300 del 14.11.2009, pag. 1).

terrà conto nella certificazione della direzione europea della qualità dei medicinali e cura della salute (DEQM). –

2. CAMPO D'APPLICAZIONE

Specie animali interessate dalle EST – Bovini, ovini, caprini e animali che sono naturalmente esposti al rischio di contrarre l'infezione tramite agenti eziologici di encefalopatie spongiformi trasmissibili o potenzialmente contaminabili per via orale, diversi dai primati⁽⁷⁾ umani e non umani, sono definiti «specie animali interessate dalle EST»⁽⁸⁾.

Materiali – La presente nota riguarda i materiali ricavati da specie animali interessate dalle EST, utilizzati per preparare:

- sostanze attive,
- eccipienti e adiuvanti, e
- materie prime o iniziali e reagenti utilizzati nel processo di fabbricazione (ad esempio, sieroalbumina bovina, enzimi; terreni di coltura, compresi quelli impiegati per preparare le banche di cellule a fini tanto di produzione quanto di costituzione di nuove banche di cellule madri per medicinali soggetti a una nuova autorizzazione di immissione in commercio).

La presente nota si applica inoltre all'utilizzo di materiali che entrano a contatto diretto con le attrezzature utilizzate nei processi di fabbricazione o con i prodotti medicinali stessi e che sono pertanto potenzialmente contaminanti.

I materiali utilizzati nella verifica dell'idoneità degli impianti e delle attrezzature, quali i terreni di coltura utilizzati nei test di simulazione del processo di ripartizione in asepsi (media fill test) per convalidare il processo di riempimento asettico, vanno considerati conformi alla presente nota esplicativa, purché il costituente o i costituenti siano ricavati da tessuti privi di infettività riscontrabile (tessuti di categoria IC), laddove sia stato considerato il rischio di contaminazione crociata con tessuti potenzialmente infettivi (cfr. sezione 3.3) e qualora i materiali siano originari di paesi a rischio di ESB trascurabile o corollato (categorie A e B, cfr. sezione 3.2). Tali informazioni saranno fornite nel fascicolo di autorizzazione di messa in commercio e verificate nel corso di ispezioni sistematiche della conformità alle buone pratiche di fabbricazione.

⁽⁷⁾ Documenti di orientamento normativo e pareri scritti sono stati pubblicati dal comitato scientifico per le specialità medicinali e dal suo gruppo di lavoro «Biologia» sui medicinali derivati da tessuti umani in relazione alla MCJ e alla vMCJ. Tali orientamenti figurano sul sito: <http://www.ema.europa.eu>

⁽⁸⁾ Suini e uccelli, che sono specie animali di interesse particolare per la produzione di medicinali, non sono naturalmente esposti al rischio di infezione per via orale. Pertanto, non rientrano tra le specie animali interessate dalle EST ai sensi della presente nota. Anche i cani, i conigli e i pesci non sono specie di animali interessate dalle EST ai sensi della presente nota.

Altri materiali quali prodotti di pulizia, emollienti e lubrificanti che entrano in contatto con il medicinale nel corso della sua ordinaria fabbricazione, o nella fase di finissaggio o nel processo di imballaggio primario sono considerati conformi alla presente nota qualora si tratti di derivati dal sego preparati secondo i processi fisico-chimici rigorosi di cui alla sezione 6.

Lotti di semenze, banche di cellule e fermentazione/produzione corrente ⁽⁹⁾ – Ai fini della conformità alle norme, i ceppi madre o le banche di cellule di partenza che figurano nelle domande di autorizzazione di immissione sul mercato, inoltrate dopo il 1° luglio 2000 (medicinali per uso umano) o dopo il 1° ottobre 2000 (medicinali veterinari), sono oggetto della presente nota esplicativa.

Ceppi madre e banche di cellule madri,

- per gli antigeni di vaccini,
- per un medicinale derivato da un procedimento biotecnologico ai sensi della parte A dell'allegato del regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio ⁽¹⁰⁾, e
- per altri medicinali che utilizzano partite di semenze e sistemi di banche di cellule nella loro fabbricazione,

già approvati per la fabbricazione di un costituente di un medicinale autorizzato, saranno considerati conformi alla presente nota esplicativa anche se incorporati nelle domande di autorizzazione di commercializzazione presentate dopo il 1° luglio 2000 (per medicinali ad uso umano) o 1° ottobre 2000 (per medicinali ad uso veterinario).

Le banche di cellule madri e i ceppi madre creati prima del 1° luglio 2000 (medicinali per uso umano) o il 1° ottobre 2000 (medicinali veterinari), ma non ancora approvati come costituenti di un prodotto medicinale autorizzato, dovranno dimostrare la loro conformità ai requisiti imposti dalla presente nota esplicativa. Qualora, per alcune materie prime o iniziali o per reagenti utilizzati per la realizzazione di tali banche di cellule o semenze, non sia più disponibile una documentazione esauriente, il richiedente dovrà presentare una valutazione dei rischi secondo le specifiche di cui alla sezione 4 della presente nota.

Saranno inoltre considerati conformi ceppi operativi o banche di cellule depositate, utilizzate per la fabbricazione di medicinali, autorizzate prima del 1° luglio 2000 (medicinali per uso umano) o il 1° ottobre 2000 (medicinali veterinari) e che sono stati approvati da un'autorità competente dello Stato membro interessato o dall'EMA, previa corretta valutazione dei rischi.

⁽⁹⁾ Cfr. inoltre: Presa di posizione sulla valutazione del rischio di trasmissione, tramite ceppi madre utilizzati per la produzione di vaccini veterinari, di agenti di encefalopatia spongiforme animale (EMA/CVMP/019/01 — febbraio 2001 — adottata dal comitato scientifico per la valutazione dei medicinali veterinari (CVMP) — luglio 2001 (GU C 286 del 12.10.2001, pag. 12).

⁽¹⁰⁾ GU L 36 del 30.4.2004, pag. 1.

Tuttavia, qualora materiali ricavati da «specie animali interessate dalle EST» siano impiegati nei processi di fermentazione/produzione sistematica o nella realizzazione di ceppi operativi o di banche di cellule da riproduzione, il richiedente deve dimostrare che tali materiali soddisfano le prescrizioni di cui alla presente nota.

3. CONSIDERAZIONI GENERALI

3.1. Principi scientifici relativi alla riduzione del rischio

In caso di possibilità di scelta dei fabbricanti, è preferibile l'impiego di materiali derivati da specie animali non interessate dalle EST o di materiali di origine non animale. Qualora nella fabbricazione vengano utilizzati materiali derivanti da specie animali interessate dalle EST al posto di materiali derivanti da specie animali non interessate dalle EST o materiali di origine non animale, tale scelta va opportunamente motivata. Qualora sia inevitabile l'impiego di materiali derivanti da specie animali interessate dalle EST vanno prese in considerazione tutte le necessarie misure intese a minimizzare il rischio di trasmissione di tali malattie.

Non sono tuttora disponibili prove diagnostiche facilmente applicabili per accertare l'infettività di EST in vivo. La diagnosi si basa su segni clinici confermati da un esame istopatologico post mortem che evidenzia la presenza di caratteristiche lesioni dei tessuti cerebrali ovvero dal rilevamento della presenza di PrP^{EST} tramite la tecnica del Western Blot (trasferimento di proteine secondo il metodo di Western) o l'immunodosaggio. Ai fini di conferma, si può anche impiegare la dimostrazione della trasmissibilità fatta inoculando tessuti sospetti nelle specie interessate o in animali da laboratorio. Tuttavia, dato il lungo periodo di incubazione delle EST, risultati di prove in vivo sono disponibili solo dopo mesi o addirittura anni.

Vari test immunochimici sono stati sviluppati per la rilevazione del PrP^{TSE} in campioni post-mortem e alcuni di essi sono attualmente considerati estremamente sensibili. Peraltro, la loro capacità di individuare un animale infetto dipende dal momento della raccolta del campione rispetto al momento di esposizione, dal tipo di tessuto raccolto e dalla dose infetta assorbita con il relativo momento di manifestazione clinica della malattia. Attualmente non si dispone di informazioni sufficienti su come ciò possa essere interessato da variazioni del ceppo.

Sebbene lo screening di animali di partenza tramite prove in vitro possa prevenire l'uso di animali agli ultimi stadi dell'incubazione della malattia e possa fornire informazioni circa la situazione epidemiologica di un determinato paese o di una determinata regione, nessuna delle prove si è rivelata idonea a confermare con certezza la negatività di un animale.

Il rischio di trasmissione di agenti patogeni di EST può venire ridotto tenendo conto dei seguenti tre parametri complementari:

- gli animali di partenza e la loro origine geografica,
- a natura dei tessuti animali utilizzati nel processo di fabbricazione e i metodi applicati per evitare
- la contaminazione crociata con materiali a rischio più elevato,
- i processi produttivi, ivi incluso il sistema di garanzia della qualità applicato per assicurare la riproducibilità e la tracciabilità del prodotto.

3.2. Origine degli animali

Le materie prime utilizzate per la riproduzione di materiali impiegati nella fabbricazione di medicinali dovranno essere ricavati da animali idonei al consumo umano in esito a ispezioni effettuate prima e dopo la macellazione conformemente ai requisiti imposti dalla legislazione UE o da legislazioni equiparate (paesi terzi). Fanno eccezione i materiali derivati da animali vivi, di cui è stato accertato lo stato di salute con esami clinici.

3.2.1. Paesi d'origine

3.2.1.1. Materiali di origine bovina

L'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE) ⁽¹¹⁾ fissa i criteri per la valutazione della situazione dei paesi nel capitolo dedicato all'encefalopatia spongiforme bovina dell'International Animal Health Code. I paesi o le regioni sono classificati nel modo seguente:

- A. paesi o regioni con un rischio di ESB trascurabile;
- B. paesi o regioni con un rischio di ESB controllato;
- C. paesi o regioni con un rischio di ESB indeterminato.

Come disposto nel regolamento (CE) n. 999/2001 della Commissione, nella versione modificata ⁽¹²⁾, la classificazione dei paesi o delle regioni in base al relativo rischio di ESB, che si basa sulle norme fissate dall'OIE, è giuridicamente vincolante nell'Unione europea a decorrere dal 1° luglio 2007. La decisione 2007/453/CE della Commissione ⁽¹³⁾, nella versione modificata, fissa la classificazione dei paesi o delle regioni in base al rischio di ESB.

In precedenza il Comitato scientifico direttivo della Commissione europea (CSD) ⁽¹⁴⁾ che ha sviluppato un sistema di classificazione dei paesi in base al rischio geografico di ESB (RGE) ⁽¹⁵⁾.

⁽¹¹⁾ http://www.oie.int/eng/Status/BSE/en_BSE_free.htm

⁽¹²⁾ Regolamento (CE) n. 722/2007 (GU L 164 del 26.6.2007, pag. 7).

⁽¹³⁾ GU L 172 del 30.6.2007, pag. 84.

⁽¹⁴⁾ Il comitato scientifico direttivo, istituito a seguito della decisione 97/404/CE della Commissione (GU L 169 del 27.6.1997, pag. 85), deve assistere quest'ultima al fine di ottenere le migliori consulenze scientifiche disponibili in materia di salute dei consumatori. Dal maggio 2003 esso è stato sostituito in tale compito dall'Agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA): <http://www.efsa.europa.eu>

⁽¹⁵⁾ La classificazione del comitato scientifico direttivo in base al rischio geografico di ESB (RGE) dà un'indicazione del livello di probabilità della presenza di uno o più capi clinicamente o pre-clinicamente affetti da ESB in un determinato paese o in una determinata regione. La tabella che segue fornisce un quadro delle quattro categorie di rischio:

Livello RGE	Presenza di uno o più bovini clinicamente o pre-clinicamente affetti da ESB in un paese/in una regione
I	Altamente improbabile
II	Improbabile ma non da escludere
III	Probabile ma non confermato o confermato a basso livello
IV	Confermato a livello elevato (≥ 100 casi/1 milione di bovini adulti all'anno)

Relazioni di valutazione RGE dei paesi sono disponibili sul sito web del CSD (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html).

Ai fini della presente nota esplicativa, andrà utilizzata la classificazione ESB basata sulle norme OIE. Qualora un paese, in precedenza classificato conformemente ai criteri RGE del CSD, non sia stato ancora classificato secondo le norme OIE, è possibile utilizzare la classificazione RGE finché non venga introdotta la classificazione OIE, a condizione che non si siano registrate modifiche rilevanti nel rischio di ESB ⁽¹⁶⁾.

Ove vi sia una scelta, gli animali dovranno avere origine da paesi con il livello più basso possibile di rischio di ESB (paesi con rischio di ESB trascurabile (categoria A)] a meno che non sia giustificato l'uso di materiali da paesi con rischio di ESB più elevato. Alcuni dei materiali identificati nella sezione 6, «Condizioni specifiche» possono derivare da paesi a rischio di ESB controllato (categoria B) e, in alcuni casi, da paesi a rischio di ESB indeterminato (categoria C), purché sottoposti ai controlli e conformi ai requisiti specificati in appresso nei capitoli corrispondenti. Eccezioni a parte, i capi di bestiame non devono provenire da paesi a rischio di ESB indeterminato (categoria C), ed è necessario produrre sempre la documentazione giustificativa dell'impiego di animali provenienti da tali paesi.

3.2.1.2. Ovini e caprini (piccoli ruminanti)

In numerose zone del mondo sono stati rilevati casi clinici di scrapie di origine naturale. Dal momento che l'ESB nelle pecore e nelle capre può essere facilmente confuso con la scrapie, a titolo di precauzione, l'approvvigionamento di materiali ricavati da piccoli ruminanti dovrà tener conto della prevalenza nel paese delle due malattie — l'ESB e la scrapie — e dei tessuti da cui tali materiali sono stati ricavati.

I criteri correlati con «mandrie bovine (chiuse) a rischio di ESB trascurabile» (cfr. sezione 3.2.2) valgono anche per i piccoli ruminanti ai fini della messa a punto di parametri per definire la situazione delle EST di un gregge di piccoli ruminanti. Per quanto riguarda le pecore, data la presumibile presenza negli ovini dell'ESB, sarà esaminato l'impiego di uno o più genotipi resistenti alle infezioni da ESB/scrapie nell'accertamento delle greggi indenni da EST ⁽¹⁷⁾. Peraltro, occorrerà tener conto del fatto che genotipi resistenti alla scrapie potrebbero essere sensibili all'ESB (esposizione orale sperimentale) o alla scrapie atipica (casi naturali). Nelle capre non è stata studiata sufficientemente a fondo la sensibilità specifica di un dato genotipo.

⁽¹⁶⁾ Secondo gli esperti il sistema di classificazione REG è abbastanza stabile e può continuare ad essere utilizzato, durante il periodo interinale, per la dimostrazione della conformità alla presente nota.

⁽¹⁷⁾ Parere del gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici in merito al «Programma di allevamento di ovini resistenti alle EST»: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775678.htm

Come fonti per l'approvvigionamento di materiale di piccoli ruminanti sono preferibili paesi che presentano una lunga storia di assenza di scrapie. La scelta eventuale di materiali di origine diversa va opportunamente giustificata.

3.2.2. Mandrie di bovini (chiuse) a rischio trascurabile di ESB

L'origine più sicura è quella da paesi o da regioni con un rischio di ESB trascurabile (paesi di categoria A). Altri paesi possono aver fatto registrare o registrano casi di ESB a un certo momento, ed è stato quindi sviluppato dal CDS e confermato dal CHMP e dal CVMP il concetto pratico di «Mandrie di bovini (chiuse) a rischio trascurabile di ESB». I criteri in base ai quali si costituisce e si mantiene una «mandria di bovini chiusa a rischio trascurabile di ESB» figurano nel parere formulato dal CSD il 22-23 luglio 1999 ⁽¹⁸⁾.

Per il momento non è possibile quantificare la riduzione del rischio geografico dell'ESB nei bovini provenienti da mandrie a rischio di ESB trascurabile (chiuse). Tale riduzione del rischio è tuttavia presumibilmente importante. La provenienza di materiali da tali mandrie di bovini chiuse va pertanto presa in considerazione ai fini della valutazione del rischio associata alla classificazione OIE del paese.

3.3. Materiali di partenza costituiti da parti anatomiche di animali o liquidi secreti corporei

In un animale affetto da EST, i vari organi e le varie secrezioni presentano livelli differenti di infettività. In caso di utilizzo di materie provenienti da «specie animali interessate dalle EST», è da preferirsi l'impiego di materiali appartenenti alla categoria di rischio più basso. Le tabelle presentate in allegato alla presente nota esplicativa ⁽¹⁹⁾ riassumono i dati attuali relativi alla ripartizione dell'infettività e della PrP^{EST} nei bovini affetti da ESB e negli ovini e caprini affetti da scrapie ⁽²⁰⁾.

Le informazioni che figurano nelle tabelle si basano esclusivamente sulle osservazioni di malattie contratte in maniera naturale o per infezione sperimentale primaria per via orale (nei bovini), ma non includono dati relativi a modelli che utilizzano ceppi di EST adattati agli animali da laboratorio, in quanto i fenotipi di ceppi che hanno subito diversi passaggi possono differire in maniera significativa e imprevedibile dai fenotipi della malattia contratta naturalmente. Dal momento che è stato provato che il rilevamento immunostochimico e/o per immunotrasferimento della proteina ospite mal configurata (PrP^{EST}) costituiva un criterio di sostituzione dell'infettività, i risultati di prove della PrP^{EST} sono stati presentati in contemporanea con i dati del biodosaggio. I tessuti sono raggruppati in tre categorie principali di infettività, a prescindere dallo stato di avanzamento della malattia:

Categoria IA: Tessuti ad elevata infettività: tessuti del sistema nervoso centrale (SNC) che raggiungono un elevato tasso di infettività negli ultimi stadi di tutte le EST, e taluni tessuti anatomicamente associati all'SNC.

Categoria IB: Tessuti a bassa infettività: tessuti periferici a infettività positiva e/o PrP^{EST} positive in almeno una delle forme delle EST.

Categoria IC: Tessuti senza infettività rilevabile: tessuti il cui esame non ha rilevato alcuna infettività e/o in cui la ricerca di PrP^{EST} ha dato risultati negativi.

I tessuti della categoria IA e le sostanze da essi derivate non devono essere utilizzati per la fabbricazione di medicinali, salvo giustificazioni contrarie (cfr. sezione 5).

Benché sia pressoché certo che la categoria di tessuti a bassa infettività (tessuti della categoria IB) includa dei tessuti (ad esempio, il sangue) che presentano un rischio minore di altri (ad esempio, i tessuti linforeticolari), i dati relativi ai livelli di infettività di tali tessuti sono troppo limitati per suddividere la categoria in diversi livelli di rischio. È inoltre evidente che l'attribuzione di un determinato tessuto a una categoria o a un'altra può essere specifica della malattia o della specie e soggetta a revisione con l'emergere di nuovi dati.

Per quanto riguarda la valutazione del rischio (cfr. sezione 4), i fabbricanti e/o i richiedenti/titolari di un'autorizzazione di immissione in commercio (AIC) dovranno tener conto delle tabelle di classificazione dei tessuti che figurano nell'allegato alla presente nota.

Le categorie elencate nelle tabelle hanno valore puramente indicativo ed è importante prender nota di quanto segue:

- In determinate circostanze si può avere **contaminazione crociata** tra tessuti appartenenti a differenti categorie di infettività. Il rischio potenziale risulterà influenzato dalle circostanze in cui ha avuto luogo l'ablazione dei tessuti, in particolare modo in caso di contatto tra tessuti a bassa infettività o a infettività non rilevabile (tessuti delle categorie IB e IC) e tessuti ad elevata infettività (tessuti della categoria IA). Pertanto la contaminazione crociata di taluni tessuti può essere incrementata se gli animali contagiati vengono abbattuti mediante penetrazione o meno nella scatola cranica, ovvero se il cervello e/o il midollo spinale vengono segati. Il rischio di contaminazione crociata sarà ridotto se i liquidi corporei sono raccolti danneggiando al minimo i tessuti e se si procede a rimuovere i componenti cellulari e a raccogliere il sangue fetale senza che vi sia contaminazione di altri tessuti materni o fetali, quali la placenta e liquidi amniotici o allantoici. Per alcuni tessuti è oltremodo difficile o addirittura impossibile evitare una contaminazione crociata con tessuti della categoria IA (ad esempio, il cranio). Di ciò va tenuto conto nella valutazione del rischio.

⁽¹⁸⁾ Parere scientifico del CSD sulle condizioni relative alle «Mandrie di bovini (chiuse) a rischio trascurabile di ESB» adottato nella riunione dei giorni 22-23 luglio 1999. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out56_en.html

⁽¹⁹⁾ Le tabelle sulla classificazione dei tessuti sono basate sugli ultimi orientamenti dell'OMS sulla «Distribuzione dell'infettività dei tessuti nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili» (2010), <http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfecivity.pdf>

⁽²⁰⁾ È attualmente in corso di riesame da parte dell'EFSA un parere scientifico sull'infettività di ESB/EST in tessuti di piccoli ruminanti (Question n. EFSA-Q-2010-052). Per informazioni più aggiornate si prega di consultare il sito seguente: <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsListLoader?mandate=M-2010-0041>

- Per alcune classi di sostanze, le tecniche utilizzate per **stordire/abbattere** l'animale possono rivestire un ruolo importante nella determinazione del rischio potenziale ⁽²¹⁾ in funzione della probabilità di disseminazione di particelle cerebrali negli organi periferici, in particolare nei polmoni. Occorre illustrare le tecniche di stordimento/abbattimento degli animali analogamente alle procedure di rimozione dei tessuti fortemente contaminanti. Vanno inoltre descritte in maniera dettagliata le procedure di prelievo dei tessuti/organi animali occorrenti e le misure applicate per evitare una contaminazione crociata con materiali ad alto rischio.
- Il rischio di contaminazione di tessuti od organi con materie del sistema nervoso centrale, sede potenziale di contaminanti dell'ESB, risultante dal metodo utilizzato per stordire l'animale prima della macellazione, dipende dai seguenti fattori:
 - il livello di infettività all'ESB del tessuto cerebrale dell'animale abbattuto,
 - l'estensione del danno cerebrale,
 - la disseminazione di particelle cerebrali nel corpo dell'animale.

Occorre tener conto di tali fattori in relazione alla classificazione OIE/RGE degli animali di partenza, all'età degli animali nel caso dei bovini e alle prove post-mortem sui bovini tramite un metodo convalidato.

I criteri corrispondenti indicati dianzi saranno applicati similmente anche a ovini e caprini.

Il rischio di contaminazione crociata dipenderà da diversi fattori complementari tra cui:

- precauzioni prese per evitare la contaminazione nel corso del prelievo dei tessuti (cfr. sopra),
- livello di contaminazione (quantitativo di tessuto contaminante),
- quantità e tipo di materiale raccolto contemporaneamente.

I fabbricanti e i possessori/richiedenti di un'autorizzazione all'immissione in commercio (AIC) dovranno tener conto del rischio connesso con la contaminazione crociata.

3.4. Età degli animali

Poiché nel caso delle EST l'accumulo dell'infettività nei bovini si verifica nell'arco di un periodo di incubazione di diversi anni, può risultare prudente utilizzare capi di bestiame giovani come fonte di materiali biologici.

La presenza di materiali infetti è stata per lo più rilevata nel sistema nervoso centrale e nei relativi tessuti nonché nel sistema

linforeticolare, a seconda dell'agente di EST (ESB nei bovini o scrapie negli ovini e caprini). Il decorso esatto dell'infettività, nelle relative parti e tessuto del corpo, dalla data dell'infezione non è nota nelle specie suddette e, di conseguenza, è difficile fornire una chiara guida circa l'età oltre la quale i vari tessuti potrebbero essere contagiati e non andrebbero raccolti. La raccomandazione originaria di raccogliere tessuti in giovane età è tuttora valida. Inoltre, occorre rilevare che i criteri di età dipendono anche dall'origine geografica. L'età costituisce un parametro più importante per i materiali originari da paesi in cui il rischio è più elevato (paesi di categoria B e C), che non di paesi con un rischio di ESB trascurabile (paesi di categoria A).

3.5. Processo di preparazione

La valutazione della riduzione globale del rischio associato alle EST di un medicinale dovrà tener conto di misure di controllo introdotte nei confronti:

- della fonte di approvvigionamento delle materie prime, e
- del processo di fabbricazione.

Il controllo della provenienza dei materiali è un criterio di importanza fondamentale per garantire l'innocuità accettabile del prodotto, data la resistenza accertata degli agenti patogeni delle EST alla maggior parte delle procedure di disattivazione.

Occorre mettere in opera sistemi di garanzia della qualità, come la certificazione ISO 9000, l'HACCP ⁽²²⁾ o la BPF (buona pratica di fabbricazione) per controllare i procedimenti di produzione e delimitare le partite (definizione e separazione delle partite, operazioni di pulizia tra una partita e l'altra). Vanno inoltre introdotte procedure per garantire la tracciabilità, nonché l'autoverifica e l'audit dei fornitori dei materiali di partenza.

Determinati processi di produzione possono contribuire considerevolmente a ridurre il rischio di contaminazione con agenti eziologici dell'EST; è questo, ad esempio, il caso dei procedimenti utilizzati nella fabbricazione del sego e dei suoi derivati (cfr. sezione 6). Dei procedimenti così rigorosi non possono essere applicati a un gran numero di prodotti, mentre altri che implicano un'azione fisica, quali la precipitazione o l'infiltrazione, per eliminare i materiali ad alto contenuto di prioni, sono probabilmente più adatti dei trattamenti chimici. Si dovrà procedere ad una descrizione dei processi di fabbricazione, ivi compresi i controlli applicati nel corso della fabbricazione ed esaminare diversi interventi che consentano la riduzione o l'eliminazione della contaminazione tramite agenti patogeni dell'EST. Laddove si tratti di più impianti di produzione, vanno identificati chiaramente i diversi interventi effettuati in ciascuno di essi. Sarà necessaria una descrizione dei provvedimenti messi in atto per garantire la tracciabilità di ciascuna partita di produzione fino al materiale di partenza.

⁽²¹⁾ Parere del CSD sui metodi di stordimento e il rischio associato all'ESB (Il rischio di disseminazione di particelle cerebrali nel sangue e nella carcassa nell'applicare determinati metodi di stordimento), adottato nella riunione dei giorni 10-11 gennaio 2002 http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out245_en.pdf

Relazione del gruppo di lavoro dell'EFSA in merito al rischio di ESB derivante dalla disseminazione di particelle cerebrali nel sangue e nella carcassa.

Question n. EFSA-Q-2003-122, adottato il 21 ottobre 2004, http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620777397.htm

⁽²²⁾ Hazard Analysis Critical Control Point (Analisi dei rischi e controllo dei punti critici).

Operazioni di pulizia – La pulizia degli impianti di lavorazione può risultare difficile da convalidare per quanto riguarda l'eliminazione degli agenti eziologici delle EST. Si è segnalato che dopo l'esposizione a preparati a tenore elevato di agenti delle EST, elementi contaminanti in quantità rilevabile possono restare attaccati alla superficie dell'acciaio inossidabile. Si ritiene che l'eliminazione di tutte le proteine assorbite tramite l'utilizzo di disinfettanti che rilasciano 1 M d'idrossido di sodio o di cloro (ad esempio, cloro a 20 000 ppm nell'arco di un'ora) costituisca un metodo accettabile nel caso di apparecchi che non possono essere sostituiti e che sono stati esposti a sostanze potenzialmente contaminate. Trattamenti più blandi con concentrazioni ridotte di alcali e di candeggina stabilizzata con un'adeguata formula con detergenti e utilizzati a temperature specifiche, hanno dimostrato un'efficacia analoga per l'eliminazione dei prioni al pari dei trattamenti classici al NaOH o al cloro. Per inattivare gli agenti delle EST si è inoltre dimostrato efficace un sistema basato su perossido di idrogeno vaporizzato. Questi nuovi trattamenti sono più compatibili con materiali delicati e possono essere adatti all'uso pratico ⁽²³⁾.

In caso di impiego di materiali a rischio nella fabbricazione di un prodotto, andranno messi in atto procedimenti di pulizia, nonché misure di controllo, allo scopo di minimizzare il rischio di contaminazione crociata tra le partite di prodotti. Tali procedimenti sono tanto più importanti quando si tratta di manipolare materiali appartenenti a diversi gruppi di rischio nello stesso impianto e con gli stessi apparecchi. In caso di utilizzo di materiali appartenenti alla categoria IA nella fabbricazione di un prodotto, andranno utilizzati apparecchi destinati a tale uso, salvo giustificazioni contrarie.

Occorre continuare la ricerca al fine di elaborare e convalidare nuove procedure di decontaminazione per ridurre il rischio di contaminazione crociata per materiali e dispositivi non compatibili con le procedure raccomandate dall'OMS.

Verifica dell'efficacia dei metodi di eliminazione/disattivazione – Gli studi per convalidare i procedimenti di eliminazione/disattivazione degli agenti patogeni dell'EST sono difficili da interpretare poiché occorre prendere in considerazione la natura del materiale contaminato intenzionalmente e la sua pertinenza nei confronti della situazione reale, il protocollo dello studio (inclusa la rappresentazione in scala ridotta dei processi) e infine il metodo di rilevamento dell'agente eziologico (dosaggio in vitro o in vivo). Occorre proseguire le ricerche per arrivare a capire quale sia «la preparazione contaminata intenzionalmente» più appropriata per gli studi di convalida. Per tali motivi, al momento attuale non sono in genere richiesti studi di convalida. Tuttavia, nell'affermare che i processi di fabbricazione sono in grado di eliminare o disattivare gli agenti eziologici delle EST e che il prodotto è quindi innocuo, occorre avvalorare una simile affermazione tramite studi di indagine pertinenti ⁽²⁴⁾.

Oltre a garantire un appropriato approvvigionamento, le case farmaceutiche sono incitate a continuare le loro indagini sui metodi di eliminazione e di disattivazione per individuare inter-

venti o procedimenti che si dimostrino proficui nel garantire l'eliminazione o la disattivazione degli agenti patogeni delle EST. In ogni caso, un processo produttivo va progettato, qualora possibile, tenendo conto delle informazioni disponibili circa i metodi ritenuti idonei a eliminare o disattivare gli agenti eziologici delle EST.

Per alcuni tipi di prodotti (cfr. sezione 6.3 «Derivati del sangue bovino»), ove non siano applicabili prontamente i processi di eliminazione/disattivazione, potrebbe rivelarsi necessaria la valutazione del processo. Quest'ultima dovrà basarsi sui materiali di partenza e su dati eventualmente pubblicati circa il rischio di EST.

4. VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI MATERIALI E SOSTANZE UTILIZZATI NELLA FABBRICAZIONE E NELLA PREPARAZIONE DI UN MEDICINALE NEL CONTESTO DEL RISPETTO DELLE NORME

La valutazione dei rischi associati alle EST esige un'attenta considerazione di tutti i parametri menzionati nella sezione 3.1 (Principi scientifici relativi alla riduzione del rischio).

Come indicato nell'introduzione alla presente nota, la conformità regolamentare dipende da risultati positivi della stima del rischio. La valutazione del rischio ad opera dei fabbricanti e/o dei titolari o richiedenti l'autorizzazione all'immissione in commercio, per i diversi materiali o le diverse sostanze derivanti da «specie animali interessate dalle EST» e utilizzate nella fabbricazione di un medicinale, deve dimostrare di aver tenuto conto di tutti i fattori di rischio associati alle EST e, qualora possibile, che il rischio è stato minimizzato tramite l'applicazione dei principi descritti nella presente nota. I certificati di conformità rilasciati dalla DEQM possono essere utilizzati dai titolari o dai richiedenti l'autorizzazione all'immissione in commercio come base delle stime del rischio.

Una valutazione globale del rischio riguardo a un medicinale, realizzata da titolari o richiedenti di un'autorizzazione all'immissione in commercio, dovrà tener conto delle stime del rischio per ciascuno dei materiali provenienti da una «specie animale interessata dalle EST» e, se del caso, della riduzione o della disattivazione degli agenti eziologici delle EST attraverso le fasi di fabbricazione della sostanza attiva e/o del prodotto finito.

La determinazione finale della conformità regolamentare spetta all'autorità competente.

Spetta ai fabbricanti e/o ai detentori o richiedenti l'AIC di medicinali per uso umano e veterinario scegliere e giustificare le misure di controllo utilizzate per un dato derivato di una «specie animale interessata dalle EST», tenendo conto degli ultimi progressi scientifici e tecnici.

5. VALUTAZIONE DEL RAPPORTO RISCHIO/BENEFICIO

Oltre ai parametri di cui alla sezione 3 (che possono essere soddisfatti da un certificato di conformità rilasciato dalla DEQM) e alla sezione 4, l'accettabilità di un particolare medicinale che contenga materiali derivati da una «specie animale interessata dall'EST» o che, a causa dei processi di fabbricazione, possa contenerli, risulterà influenzata da diversi fattori, tra i quali:

- la via di somministrazione dei medicinali,
- la quantità di tessuto animale impiegata nei medicinali,

⁽²³⁾ Orientamenti dell'OMS sulla distribuzione dell'infettività dei tessuti nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili (2006) <http://www.who.int/bloodproducts/tse/WHO%20TSE%20Guidelines%20FINAL-22%20JuneupdatedNL.pdf>

⁽²⁴⁾ Orientamenti in merito all'indagine del processo di fabbricazione per i medicinali derivati dal plasma per quanto riguarda il rischio di vCJD CPMP/BWP/5136/03.

- la posologia terapeutica massima (dosi giornaliere e durata del trattamento),
- l'impiego cui è destinato il prodotto e il suo beneficio clinico,
- la presenza di una barriera fra specie.

Salvo nel caso in cui tale impiego sia debitamente giustificato, i tessuti altamente contaminanti (appartenenti alla categoria IA) e le sostanze da essi derivate non vanno impiegati nella fabbricazione di medicinali né dei relativi materiali di base e dei prodotti intermedi (incluse sostanze attive, eccipienti e reagenti). Se del caso, si dovrà giustificare il perché del mancato utilizzo di altri materiali. In tali circostanze eccezionali e con le necessarie giustificazioni si può prospettare l'impiego di materiali a rischio elevato per la fabbricazione di sostanze attive, quando, dopo aver proceduto alla valutazione dei rischi (secondo le modalità descritte nella sezione 4 della presente nota), e tenuto conto dell'impiego cui il prodotto è destinato, chi richiede l'autorizzazione alla commercializzazione è in grado di documentare l'esistenza di un rapporto rischi/benefici positivo. Le sostanze ricavate da materiali appartenenti alla categoria IA, qualora ne sia giustificato l'uso, devono essere ricavate da animali provenienti da paesi a rischio di ESB trascurabile (categoria A).

6. CONSIDERAZIONI SPECIFICHE

I materiali elencati in appresso ricavati da «specie animali interessate dalle EST» sono considerati conformi alla presente nota purché essi soddisfino quantomeno alle condizioni specificate nel seguito. Il richiedente/titolare di un'autorizzazione all'immissione in commercio dovrà fornire informazioni pertinenti o un certificato di conformità rilasciato dalla DEQM.

6.1. Collagene

Il collagene è un costituente proteico fibroso del tessuto connettivo dei mammiferi.

Per quanto riguarda il collagene, vanno forniti documenti comprovanti la conformità alla presente nota, tenendo conto delle disposizioni indicate nelle sezioni 3-5. Vanno inoltre presi in considerazione i seguenti elementi:

- per il collagene prodotto da ossa, sono applicabili le condizioni indicate per la gelatina (cfr. in appresso); la capacità di inattivazione è presumibilmente più bassa nel processo di fabbricazione del collagene che non in quello della gelatina. Di conseguenza, l'origine diventa un aspetto più critico da prendere in esame,
- il collagene prodotto da tessuti quali pelli, tendini e muscoli non presenta in genere rischi misurabili di EST a condizione che la contaminazione con materiali potenzialmente infetti, ad esempio, fuoriuscita accidentale di sangue e/o tessuti del sistema nervoso centrale, sia evitata nel corso del prelievo. Le pelli rappresentano quindi una materia prima più sicura per gli impianti umani derivati dal collagene. Peraltro, sarà difficile da eliminare la contaminazione crociata con mate-

riale cerebrale fuoriuscito durante il processo di abbattimento, che può essersi seccato sulla superficie delle pelli. Si tratta di un altro aspetto da considerare nella valutazione della sicurezza del materiale di partenza.

Il processo di fabbricazione del collagene può avere alcune fasi in comune con la fabbricazione di gelatina, ad esempio trattamento alcalino e al solfato di sodio, trattamenti all'idrossido di calcio e all'idrossido di sodio o trattamento enzimatico. D'altra parte, anche le fasi in comune possono differire nella durata e nelle condizioni del pH, che possono tradursi in differenze significative nella rispettiva capacità di inattivazione. Per garantire la sicurezza del prodotto i fabbricanti dovranno quantomeno effettuare una valutazione del processo basata sulle somiglianze delle fasi di trattamento del collagene rispetto alle fasi note di inattivazione nella fabbricazione della gelatina. Oltre che nel trattamento, esistono differenze anche nell'uso finale del materiale e, di conseguenza, nella valutazione del rischio; mentre la gelatina è ampiamente utilizzata per amministrazione orale, molte applicazioni al collagene sono sotto forma di impianti chirurgici. Anche di questo aspetto va tenuto conto nella valutazione finale del rischio.

6.2. Gelatina

La gelatina è una proteina naturale, solubile, gelificante o meno, ottenuta dall'idrolisi parziale del collagene prodotto a partire dall'osso e dalle pelli di animali.

Per quanto riguarda la gelatina, vanno fornite prove della conformità ai presenti principi informativi, tenendo conto delle disposizioni indicate alle sezioni 3-5. Vanno inoltre presi in considerazione i seguenti elementi ⁽²⁵⁾:

i) Il materiale di partenza utilizzato

La gelatina impiegata nei medicinali può essere prodotta a partire da ossa o da pelli.

- *Pelli come materia prima* – In base alle conoscenze attuali, le pelli utilizzate per la produzione di gelatina rappresentano una materia di partenza molto più sicura dell'osso. Tuttavia, si raccomanda di procedere a misure che consentano di evitare la contaminazione crociata con materiali potenzialmente infetti nel corso del prelievo.
- *Ossa come materiali di partenza* – Per la produzione di gelatina a partire da ossa, la qualità dei materiali di partenza è il parametro fondamentale che garantirà la sicurezza del prodotto finale. Occorre quindi procedere nel modo seguente:
 - 1) rimuovere dalle ossa raccolte (materie prime/di partenza) i crani e il midollo spinale, a prescindere dall'età o dal paese di origine dei bovini;
 - 2) rimuovere dalle materie prime/di partenza le vertebre di bovini di età superiore a 30 mesi originari dei paesi con un rischio di ESB controllato o indeterminato (categorie B o C);

⁽²⁵⁾ In base al parere del gruppo di esperti scientifici sui rischi biologici dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare concernente la «Valutazione quantitativa del rischio per gli esseri umani di ESB rappresentato dalla gelatina per quanto riguarda il rischio residuo di ESB», The EFSA Journal, 312, (1-28). http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620776107.htm
I requisiti per la selezione del materiale di partenza e la fabbricazione sono idonei per la gelatina somministrata per via orale o parenterale o utilizzata nei medicinali ad uso umano e veterinario.

- 3) fabbricare la gelatina per uso parenterale unicamente da ossa originarie di paesi con un rischio di ESB trascurabile o controllato (rispettivamente categorie A e B). La gelatina per uso orale può essere fabbricata da ossa originarie di paesi con un rischio di ESB trascurabile, controllato o indeterminato (rispettivamente categorie A, B e C);
- 4) la gelatina deve essere fabbricata utilizzando uno dei metodi di fabbricazione descritti di seguito.

ii) Metodi di fabbricazione

- *Pelli* – Per quanto riguarda la gelatina ricavata dalle pelli non sono richieste misure specifiche per quanto riguarda le condizioni di manipolazione, purché siano attuati i necessari controlli per evitare la contaminazione crociata durante le operazioni di prelievo delle pelli o il processo di fabbricazione.
- *Ossa* – Quando come materiale di partenza sono utilizzate ossa, il modo di fabbricazione sarà il secondo parametro che garantirà la sicurezza della gelatina.
 - La gelatina può essere fabbricata da ossa originarie di paesi con un rischio di ESB trascurabile, controllato e indeterminato (categorie A, B o C) conformemente alle condizioni di cui alla sezione 6.2.i), utilizzando il processo di fabbricazione acido, alcalino o a caldo/a pressione.
 - Il processo di fabbricazione è preso in considerazione nell'effettuare la valutazione del rischio come precisato nella sezione 4 della presente nota esplicativa. Entrambi i metodi di fabbricazione acido e alcalino hanno mostrato in generale una simile inattivazione/eliminazione dell'infettività da EST negli esperimenti di convalida della gelatina. Studi hanno dimostrato che un trattamento alcalino supplementare (pH 13, 2 ore) delle ossa/dell'osseina rafforza ulteriormente la capacità di inattivazione/eliminazione delle EST del processo di fabbricazione. Alla sicurezza della gelatina contribuiscono altre fasi di trattamento quali la filtrazione, la cromatografia a scambio ionico e la sterilizzazione UHT.
 - Un processo tipico di fabbricazione alcalina consiste nel frantumare finemente le ossa, sgrassarle con acqua calda e demineralizzarle con l'acido cloridrico diluito (a una concentrazione minima del 4 % e un pH < 1,5) per un periodo minimo di due giorni al fine di produrre osseina. Tale procedimento è seguito da un trattamento alcalino con soluzione satura di calce (pH almeno 12,5) per un periodo minimo di 20 giorni.
 - È possibile trattare con un procedimento acido anche le ossa dei bovini. La fase del trattamento con la calce viene in quel caso sostituita da un pretrattamento acido nel corso del quale l'osseina è trattata a pH < 3,5 per un minimo di 10 ore.

- Una fase di riscaldamento «istantaneo» (sterilizzazione) a 138 °C per 4 secondi segue il processo di fabbricazione acido e alcalino.
- Nel processo a caldo/a pressione le ossa frantumate, sgrassate e disseccate sono autoclavate con vapore saturato a una pressione superiore a 3 bar e a una temperatura minima di 133 °C, durante almeno 20 minuti, con successiva estrazione della proteina con acqua calda.

Le fasi finali sono simili per i processi alcalino, acido e a caldo/a pressione e comprendono un'estrazione della gelatina, successivamente lavata, filtrata e concentrata.

6.3. Sangue e derivati del sangue bovino

Il siero fetale bovino è utilizzato comunemente per le colture cellulari. Il siero fetale bovino andrà ricavato a partire da feti prelevati in impianti di macellazione da vacche sane e idonee al consumo umano; dovrà essere prelevato l'intero utero e il sangue fetale raccolto in uno spazio o in una zona ad hoc tramite puntura cardiaca in un sistema di prelievo chiuso, in ambiente asettico.

Il siero di vitelli neonati è ottenuto a partire da vitelli di meno di 20 giorni e il siero di vitelli a partire da animali di età inferiore a 12 mesi. Nel caso di siero bovino di un donatore, a condizione che esso provenga da animali di età inferiore a 36 mesi, dovrà essere definita chiaramente e documentata la negatività all'EST della mandria donatrice. In ogni caso il siero sarà prelevato secondo protocolli specifici da personale formato a tali procedure, al fine di evitare la contaminazione crociata con tessuti ad elevato rischio.

Per quanto riguarda il sangue e i derivati del sangue bovino, vanno fornite prove della conformità ai requisiti della presente nota, tenendo conto delle disposizioni di cui alle sezioni 3-5. Vanno inoltre presi in considerazione i seguenti elementi:

i) Tracciabilità

L'impianto di macellazione dovrà essere rintracciabile per ciascuna partita di siero o plasma. I mattatoi dovranno disporre di elenchi disponibili di aziende da cui provengono gli animali. Qualora il siero sia ricavato da animali vivi, dovranno essere disponibili per ciascuna partita di siero dati che assicurino la tracciabilità del prodotto per risalire agli allevamenti di origine.

ii) Origine geografica

Benché l'infettività dei tessuti associata all'ESB nei bovini sia meno diffusa che per la scrapie degli ovini e dei caprini, come misura cautelativa, il sangue bovino dovrà provenire da paesi di categoria A. Il sangue bovino da paesi di categoria B è anch'esso accettabile a condizione che non vi siano rischi di contaminazione crociata del sangue con materia cerebrale a seguito dell'abbattimento di animali di età superiore a 21 mesi ⁽²⁶⁾.

⁽²⁶⁾ Parere del gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici in merito alla valutazione del limite di età nei bovini per l'eliminazione di materiale a specifico rischio (SRM). Question n. EFSA-Q-2004-146, adottato il 28 aprile 2005.

iii) Metodi di stordimento

Quando i tessuti sono prelevati da animali abbattuti, il metodo di macellazione è importante per garantire la sicurezza del materiale. È stato dimostrato che lo stordimento tramite pistola a proiettile captivo, con o senza enervazione, o tramite pistola pneumatica, in particolare tramite iniezione di aria, può distruggere il cervello e disseminare materia cerebrale nella corrente sanguigna. Lo stordimento senza penetrazione non è più ritenuto un'alternativa allo stordimento con penetrazione, in quanto è stata rilevata una contaminazione del sangue con materia cerebrale⁽²⁷⁾. È presumibile un rischio trascurabile con la galvanonarcosi⁽²⁸⁾, ma anche quest'ultima non offre una sicurezza completa in quanto, in caso di insuccesso, gli animali possono dover subire un ulteriore stordimento. I metodi di stordimento dovranno pertanto essere specificati per il processo di raccolta del sangue bovino.

Ove nell'abbattimento abituale non possa essere evitato il rischio di contaminazione crociata del sangue con materia cerebrale in paesi con rischio di ESB controllato (categoria B), durante la fabbricazione occorre applicare misure di sicurezza, ad esempio la limitazione dell'età dei bovini e/o la riduzione degli agenti infettivi.

iv) Età

Per i paesi con un rischio di ESB controllato (categoria B), sarà applicabile un limite di età cautelativo di 21 mesi per il sangue

o i derivati del sangue bovino qualora non si possa prevedere, dalla fabbricazione, una riduzione rilevante degli agenti eziologici delle EST. Un limite di età di 30 mesi è ritenuto sufficiente per i derivati del sangue, a condizione che si possa dimostrare, come descritto nei paragrafi seguenti, una significativa riduzione degli agenti eziologici delle EST.

v) Riduzione degli agenti eziologici delle EST durante la fabbricazione

Gli studi di indagine dovrebbero fornire una stima, per i derivati del sangue, della capacità del processo di fabbricazione di ridurre/eliminare gli agenti eziologici delle EST. La stima può essere basata su dati pubblicati o dati interni purché essi si dimostrino pertinenti al processo di fabbricazione specifico. Ove non si possa concludere che la capacità di riduzione è comparabile, si raccomanda ai fabbricanti di effettuare studi di indagine per il prodotto specifico. Possono essere sufficienti indagini che si avvalgono di dosaggi biochimici, sempreché vi siano elementi scientifici atti a comprovare che tali sondaggi sono in relazione con i dati sull'infettività. È stato elaborato un orientamento generale per gli studi di indagine sulla riduzione degli agenti eziologici delle EST⁽²⁹⁾. Le preparazioni contaminate intenzionalmente derivate dal cervello sono adatte a studi sull'analisi del rischio derivato dal sangue contaminato da particelle cerebrali.

Tabella 1

Concetto di accettazione di sangue bovino/sieri e derivati

Prodotto	Siero fetale bovino	Siero di vitello donatore	Siero di bovino adulto donatore	Siero di vitello	Siero di bovino adulto/plasma	Siero di bovino adulto/plasma/derivato del siero	Derivato del siero di bovino adulto	Derivato del siero di bovino adulto
Origine geografica dei bovini	Cat. A e B	Cat. A e B	Cat. A e B ⁽¹⁾	Cat. A e B	Cat. A	Cat. B	Cat. A	Cat. B
Età dei bovini	non nato	< 1 anno	< 36 mesi	< 1 anno	Nessun limite	< 21 mesi ⁽²⁾	Nessun limite	< 30 mesi
Macellazione/contaminazione crociata del sangue con l'SnC	Nessun rischio di contaminazione crociata			Rischio di contaminazione crociata				
Dimostrazione della riduzione di prioni nel corso della fabbricazione	No			No				Si ⁽³⁾

⁽¹⁾ Se provenienti da paesi della Categoria B, i bovini dovranno essere mandrie ben definite e documentate.

⁽²⁾ Può essere consentito un limite superiore di età se si esclude chiaramente la contaminazione crociata del sangue con materiali dell'SnC (ad esempio, macellazione rituale islamica = halal).

⁽³⁾ Può non essere richiesta la dimostrazione della riduzione dei prioni se si può escludere chiaramente la contaminazione crociata del sangue con materiali dell'SnC (ad esempio, macellazione rituale islamica = halal).

6.4. Derivati del sego

Il sego è il grasso ottenuto a partire da tessuti, incluse le zone sottocutanee, addominali e intramuscolari e ossa. Il sego utiliz-

zato come materia prima nella fabbricazione dei suoi derivati deve essere ricavato da «materiali della categoria 3 o equivalente», come è definito nel regolamento (CE) n. 1774/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 3 ottobre 2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano.

I derivati del sego, quali glicerolo e acidi grassi, fabbricati a partire dal sego mediante procedimenti rigorosi sono stati

⁽²⁷⁾ Orientamenti dell'OMS sulla distribuzione dell'infettività dei tessuti nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili (2006), <http://www.who.int/bloodproducts/tse/WHO%20TSE%20Guidelines%20FINAL-22%20juneupdatedNL.pdf>

⁽²⁸⁾ Relazione del gruppo di lavoro EFSA in merito al rischio di ESB dalla disseminazione di particelle cerebrali nel sangue e nella carcassa. Question n. EFSA-Q-2003-122, adottato il 21 ottobre 2004, http://www.efsa.europa.eu/en/science/biohaz/biohaz_opinions/opinion_annexes/733.html

⁽²⁹⁾ Orientamento sull'indagine del processo di fabbricazione per i medicinali derivati dal plasma per quanto riguarda il rischio di vCJD CPMP/BWP/5136/03.

sottoposti a esami specifici dal CSP e dal CMV in base ai quali si ritiene fortemente improbabile che si presenti un rischio di contagio. Ne consegue che i materiali prodotti in condizioni rigorose almeno quanto quelle citate in appresso, vanno considerati conformi alla presente nota esplicativa, qualsivoglia sia la loro origine geografica o la natura dei tessuti da cui siano stati ricavati i derivati del sego. Esempi di procedimenti rigorosi sono:

- la transesterificazione o idrolisi sotto pressione, a una temperatura di almeno 200 °C per almeno 20 minuti (per la produzione di glicerolo, acidi grassi ed esteri degli acidi grassi);
- la saponificazione con NaOH 12 M (per la produzione di glicerolo e saponi);
- processo discontinuo: temperature non inferiori a 95 °C per periodi non inferiori alle 3 ore,
- processo continuo: temperature non inferiori a 140 °C sotto pressione, in tempi non inferiori agli 8 minuti o valori equivalenti,
- distillazione a 200 °C.

È improbabile che i derivati del sego fabbricati in tali condizioni presentino un qualsivoglia rischio di contagio di EST. Vanno pertanto considerati conformi alla presente nota esplicativa.

Nel caso dei derivati del sego prodotti in condizioni diverse, occorre dimostrare la loro conformità alla presente nota.

6.5. *Carbone animale*

Il carbone animale è preparato mediante carbonizzazione di tessuti animali, ad esempio ossa, utilizzando temperature superiori a 800 C. Salvo diversa motivazione, il materiale di partenza per la fabbricazione di carbone animale è il materiale di categoria 3 o equivalente, come definito nel regolamento (CE) n. 1774/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 3 ottobre 2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano. A prescindere dall'origine geografica o dalla natura del tessuto, ai fini della conformità regolamentare, il nero animale dovrà essere considerato conforme alla presente nota esplicativa.

È improbabile che il nero d'ossa, fabbricato a tali condizioni, presenti un qualsivoglia rischio di EST. Va pertanto considerato conforme alla presente nota. Nel caso di nero animale prodotto in condizioni diverse, occorre dimostrarne la conformità alla presente nota.

6.6. *Latte e derivati del latte*

Alla luce delle conoscenze scientifiche attuali, il latte bovino non presenta presumibilmente alcun rischio di contaminazione da agenti eziologici dell'EST⁽³⁰⁾, qualsivoglia sia la sua provenienza geografica.

Alcuni materiali, lattosio incluso, sono estratti dal siero di latte, parte liquida restante dalla coagulazione del latte nella produzione del formaggio. La coagulazione può comportare l'impiego di presame di vitello, un estratto di caglio, o presame ricavato da altri ruminanti. Il CHMP e il CMVP hanno effettuato una stima del rischio associato al lattosio e altri derivati del siero di latte prodotti utilizzando presame di vitello e hanno concluso che il rischio di EST è trascurabile, quando il presame di vitello è prodotto conformemente ai processi descritti nel rapporto di valutazione del rischio⁽³¹⁾. La conclusione è stata confermata dal CSD⁽³²⁾, che ha inoltre effettuato una stima del rischio di contaminazione da EST rappresentato dal presame in genere⁽³³⁾.

È improbabile che i derivati del latte prodotti alle condizioni descritte in appresso presentino qualsivoglia rischio di contaminazione da EST. Essi vanno pertanto considerati conformi alla presente nota.

- Il latte è raccolto da animali sani in condizioni identiche a quelle applicate al latte raccolto per il consumo umano, e
- nella preparazione di tali derivati non vengono impiegati altri materiali ricavati da ruminanti, ad eccezione del presame di vitello (ad esempio, trattamento della caseina con enzimi pancreatici).

Occorre comprovare la conformità alla presente nota esplicativa dei derivati del latte ottenuti tramite altri procedimenti o tramite l'impiego del presame ricavato da altre specie di ruminanti.

6.7. *Derivati della lana*

I presenti principi si applicano ai prodotti derivati dalla lana e dai peli dei ruminanti, quali la lanolina e gli alcoli di lana derivati dai peli, a patto che la lana e i peli provengano da animali vivi.

⁽³⁰⁾ Quanto al latte e ai derivati del latte di piccoli ruminanti, consultare il parere dell'EFSA, Question n. EFSA-Q-2008-310, adottato il 22 ottobre 2008, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/849.htm>

⁽³¹⁾ Il comitato per i medicinali per uso umano e il suo gruppo di lavoro «Biologia» hanno effettuato una stima del rischio e una valutazione regolamentare riguardante il lattosio preparato con l'impiego di presame di vitello. La stima del rischio ha tenuto conto della provenienza degli animali, dell'ablazione dell'abomaso e della disponibilità di procedure ben definite di garanzia della qualità. La qualità dei sostituti del latte impiegati per alimentare gli animali da cui è stato ricavato l'abomaso è di importanza fondamentale. Tale relazione è accessibile sul sito <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pus/057102.pdf>

⁽³²⁾ Dichiarazione provvisoria in merito alla sicurezza del presame di vitello per la fabbricazione di lattosio, adottata dal CSD nella sua riunione dei giorni 4 e 5 aprile 2002 (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out255_en.pdf).

⁽³³⁾ Il CSD ha emesso un parere sulla sicurezza del presame animale nei confronti dei rischi di EST animale e di ESB in particolare, adottato nella riunione del 16 maggio 2002 (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out265_en.pdf).

È improbabile che i derivati della lana prodotti a partire dalla lana prelevata da animali macellati dichiarati «idonei al consumo umano», il cui processo di fabbricazione (pH, temperatura e durata del trattamento) soddisfi almeno a una delle condizioni di trattamento definite in appresso, presentino un qualsivoglia rischio di contaminazione da EST. Essi vanno pertanto considerati conformi alla presente nota esplicativa.

— Trattamento a $\text{pH} \geq 13$ (iniziale, corrispondente ad una concentrazione di NaOH di almeno 0,1 M NaOH) a una temperatura $\geq 60^\circ\text{C}$ per almeno un'ora, effettuato normalmente durante la fase di reflusso del trattamento alcalino-organico;

— distillazione molecolare a una temperatura $\geq 220^\circ\text{C}$ sotto pressione ridotta.

Occorre dimostrare la conformità alla presente nota esplicativa dei derivati della lana prodotti in condizioni diverse.

6.8. **Amminoacidi**

Gli amminoacidi possono essere ottenuti tramite idrolisi dei materiali provenienti da fonti diverse.

Salvo giustificazione contraria, la materia prima nella fabbricazione di amminoacidi dovrà essere «materiale della categoria 3 o equivalente», quale definito dal regolamento (CE) n. 1774/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 3 ottobre 2002, recante norme sanitarie relative ai sottoprodotti animali non destinati al consumo umano.

Sono ritenuti conformi alla presente nota gli amminoacidi preparati utilizzando le condizioni di trattamento sotto descritte, che verosimilmente non presentano rischi di EST.

— Amminoacidi prodotti da pelli e pellami sono ottenuti tramite un processo che prevede l'esposizione del materiale a

un pH di 1-2, quindi a un $\text{pH} > 11$, seguito da un trattamento termico a 140°C per 30 minuti a una pressione di 3 bar,

— gli amminoacidi o peptidi risultanti sono filtrati dopo la produzione, e

— è effettuata un'analisi impiegando un metodo sensibile e convalidato per controllare l'assenza di macromolecole intatte residue, con un limite appropriato fissato.

Occorre dimostrare la conformità alla presente nota esplicativa degli amminoacidi preparati in condizioni diverse.

6.9. **Peptoni**

I peptoni sono idrolizzati parziali di proteine ottenuti mediante digestione enzimatica o acida. Essi sono utilizzati in mezzi di coltura microbiologica per fornire i requisiti nutrizionali di microrganismi, che possono essere utilizzati come ceppi madre o in fermentazioni su scala industriale per la produzione di prodotti ad uso umano e veterinario, inclusi i vaccini. È oggetto di notevole interesse l'utilizzo di proteine vegetali come alternativa alle proteine animali. Peraltro:

— ove la gelatina sia utilizzata come materiale di partenza della proteina, si fa riferimento alla sezione 6.2, gelatina, della presente nota,

— ove la caseina sia utilizzata come materiale di partenza della proteina, si fa riferimento alla sezione 6.6, latte e derivati del latte, della presente nota,

— ove il tessuto di specie di animali interessati dalle EST sia il materiale di partenza per la proteina, il tessuto deve provenire da animali atti al consumo (cfr. sezione 3.2, animali di partenza, della presente nota) con un'età massima di 30 mesi per i bovini provenienti da paesi a rischio di ESB controllato (categoria B). L'età degli animali non è un fattore importante per gli animali originari di paesi con un rischio di ESB trascurabile (categoria A).

ALLEGATO

Categorie principali di infettività

Le tabelle che seguono sono desunte dagli orientamenti dell'OMS sulla distribuzione dell'infettività dei tessuti nelle encefalopatie spongiformi trasmissibili (2010).

I dati sono registrati come segue:

- + Presenza di infettività o di PrP^{EST}
- Assenza di infettività o di PrP^{EST} rilevabili

NT Non provato

? Risultati discutibili o incerti

Categoria IA: Tessuti ad elevata infettività

Tessuto	Bovini		Ovini e caprini		Alci e cervi	
	ESB		Scrapie		CWD	
	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}
Cervello	+	+	+	+	+	+
Midollo spinale	+	+	+	+	NT	+
Retina	+	NT	NT	+	NT	+
Nervo ottico ⁽²⁾	+	NT	NT	+	NT	+
Gangli spinali	+	+	+	+	NT	+
Gangli trigemini	+	+	NT	+	NT	-
Ipfisi ⁽³⁾	-	NT	+	+	NT	+
Dura madre ⁽³⁾	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Categoria IB: Tessuti a bassa infettività

Tessuto	Bovini		Ovini e caprini		Alci e cervi	
	ESB		Scrapie		CWD	
	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}
<i>Sistema nervoso periferico</i>						
Nervi periferici	+	+	+	+	NT	+
Gangli autonomi ⁽⁴⁾	NT	+	NT	+	NT	+
<i>Tessuti linforeticolari</i>						
Milza	-	-	+	+	NT	+
Linfonodi	-	-	+	+	NT	+

Tessuto	Bovini		Ovini e caprini		Alci e cervi	
	ESB		Scrapie		CWD	
	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}
Tonsille	+	-	+	+	NT	+
Membrana nictitante	+	-	[+]	+	NT	+
Timo	-	NT	+	+	NT	-
<i>Trattoalimentare ⁽⁵⁾</i>						
Esofago	-	NT	[+]	+	NT	+
Pre-stomaco ⁽⁶⁾ (solo ruminanti)	-	NT	[+]	+	NT	+
Stomaco/abomaso	-	NT	[+]	+	NT	+
Duodeno	-	-	[+]	+	NT	+
Intestino digiuno ⁽⁷⁾	-	+	[+]	+	NT	NT
Ileo ⁽⁷⁾	+	+	+	+	NT	+
Appendice	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Colon/cieco ⁽⁷⁾	-	-	+	+	NT	+
Retto	NT	NT	NT	+	NT	+
<i>Tessutiriproduttivi</i>						
Placenta ⁽⁸⁾	-	NT	+	+	NT	-
Ovaio ⁽³⁾	-	NT	-	-	NT	-
Utero ⁽³⁾	-	NT	-	-	NT	-
<i>Altritessuti</i>						
Ghiandola mammaria/ mammella ⁽⁹⁾	-	NT	-	+	NT	NT
Pelle ⁽³⁾ , ⁽¹⁰⁾	-	NT	-	+	[+]	[+]
Tessuto adiposo	-	NT	NT	NT	[+]	NT
Cuore/pericardio	-	NT	-	NT	NT	+
Polmone	-	NT	-	-	NT	+
Fegato ⁽³⁾	-	NT	+	-	NT	-
Rene ⁽³⁾ , ⁽¹¹⁾	-	-	[+]	+	NT	+
Ghiandola surrenale	[+]	+	+	-	NT	+
Pancreas ⁽³⁾	-	NT	+	NT	NT	+

Tessuto	Bovini		Ovini e caprini		Alci e cervi	
	ESB		Scrapie		CWD	
	Infettività (!)	PrP ^{EST}	Infettività (!)	PrP ^{EST}	Infettività (!)	PrP ^{EST}
Midollo osseo ⁽¹²⁾	(+)	NT	+	NT	NT	–
Muscolo interosseo ⁽¹³⁾	[+]	NT	[+]	+	[+]	–
Lingua ⁽¹⁴⁾	–	NT	[+]	+	NT	–
Vasi sanguigni	–	NT	NT	+	NT	–
Mucosa nasale ⁽¹⁵⁾	–	NT	+	+	NT	+
Ghiandola salivare	–	NT	+	NT	–	–
Cornea ⁽¹⁶⁾	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Liquidi, secrezioni e secrezioni corporei

CSF	–	NT	+	–	NT	NT
Sangue ⁽¹⁷⁾	–	?	+	?	+	?
Saliva	NT	NT	–	NT	+	[–]
Latte ⁽¹⁸⁾	–	–	+	[+]	NT	NT
Urina ⁽¹⁹⁾	–	NT	–	–	–[+]	[+]
Feci ⁽¹⁹⁾	–	NT	–	NT	–[+]	NT

Categoria IB: Tessuti a bassa infettività

Tessuto	Bovini		Ovini e caprini		Alci e cervi	
	ESB		Scrapie		CWD	
	Infettività (!)	PrP ^{EST}	Infettività (!)	PrP ^{EST}	Infettività (!)	PrP ^{EST}
<i>Tessuti riproduttivi</i>						
Testicolo	–	NT	–	–	NT	–
Prostata/epididimo/vescicola seminale	–	NT	–	–	NT	–
Sperma	–	NT	–	–	NT	NT
Liquidi placentari	–	NT	NT	NT	NT	NT
Feto ⁽²⁰⁾	–	NT	–	–	NT	(–)
Embrione ⁽²⁰⁾	–	NT	?	NT	NT	NT

Tessuto	Bovini		Ovini e caprini		Alci e cervi	
	ESB		Scrapie		CWD	
	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}	Infettività ⁽¹⁾	PrP ^{EST}
<i>Tessutimuscolo - scheletrici</i>						
Osso	–	NT	NT	NT	NT	NT
Tendine	–	NT	NT	NT	NT	NT
<i>Altri tessuti</i>						
NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Polpa dentale	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Trachea	–	NT	NT	NT	NT	–
Ghiandola tiroidea	NT	NT	–	NT	NT	–
<i>Liquidi, secrezioniedescrezionicorporei</i>						
Colostro ⁽²¹⁾	(–)	–	(?)	NT	NT	NT
Cordone ombelicale ⁽²¹⁾	–	NT	NT	NT	NT	NT
Sudore	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Lacrime	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Mucosa nasale	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Bile	NT	NT	NT	NT	NT	NT

⁽¹⁾ BIODOSAGGI dell'infettività dei tessuti umani sono stati effettuati sia su primati che su topi (o su entrambi); biosaggi dell'infettività dei tessuti bovini sono stati effettuati sia su bovini che su topi (o su entrambi); la maggior parte dei biosaggi dell'infettività dei tessuti degli ovini e/o dei caprini sono stati effettuati solo sui topi. Per quanto riguarda ovini e caprini non tutti i risultati sono compatibili per le due specie; ad esempio, due capre (ma non pecore) hanno contratto la ESB in modo naturale [Eurosurveillance, 2005, Jeffrey et al., 2006]. Analogamente, la maggior parte dei risultati descritti per la CWD sono stati desunti da studi sui cervi e i risultati possono differire per gli alci o altri odoceli.

⁽²⁾ Nei modelli sperimentali delle EST, il nervo ottico si è dimostrato un mezzo di neuroinvasione e contenente titoli elevati di infettività.

⁽³⁾ Non è stato registrato alcun dato sperimentale riguardante l'infettività dell'ipofisi o della dura madre umana con tutte le forme di EST, ma la dura madre di cadavere liofilizzato e ormoni della crescita ricavati dall'ipofisi di cadaveri hanno trasmesso la malattia a centinaia di persone; l'ipofisi e la dura madre vanno pertanto incluse nella categoria dei tessuti a rischio elevato. Il PrP^{EST} è stato rilevato mediante immunoblot nella dura madre di un paziente affetto da vCJD che è deceduto negli Stati Uniti dopo un periodo di incubazione insolitamente lungo (cfr. altresì tabella IB per altri tessuti positivi: pelle, rene, fegato, pancreas, ovaio e utero) [Notari et al., 2010]. Occorre rilevare che studi precedenti di numerosi casi esaminati nel Regno Unito hanno rilevato la negatività di tutti questi tessuti [Ironsides et al., 2002; Head et al., 2004].

⁽⁴⁾ Nei bovini, in cattle, PrP^{EST} è stato rilevato in maniera inconsistente nel plesso enterico nell'ileo distale, ma l'esame immunocitochimico dei tessuti di un singolo caso di ESB (tra i capi morti) in Giappone presuppone, sebbene non chiaramente, l'interessamento di plessi mienterici nell'intestino tenue e nell'intestino crasso [Kimura e Haritani, 2008].

⁽⁵⁾ Nella vCJD, il PrP^{EST} si limita al tessuto linfoide e nervoso associato all'intestino (la mucosa, il muscolo e le serose danno risultati negativi).

⁽⁶⁾ Il pre-stomaco dei ruminanti (reticolo, rumen e omasum) è normalmente consumato, come il vero e proprio stomaco (abomaso). Il presame si ricava anche dall'abomaso dei bovini (e talvolta degli ovini).

⁽⁷⁾ Allorché si è utilizzata una dose orale rilevante di ESB per contagiare i bovini su base sperimentale, si è rilevata infettività nell'intestino digiuno e ileo-cieco in topi Tg con una sovraespressione del PrP [cortesia del Dr. M Groschup]. Il PrP^{EST} è stato rilevato a bassi livelli nel tessuto linfoide dell'ileo [Terry et al., 2003] ed è stato individuato con una frequenza anche inferiore nel tessuto linfoide dell'intestino digiuno dei bovini contagiati in modo analogo per via orale [EFSA, 2009].

⁽⁸⁾ Un'unica dichiarazione di trasmissione di infettività sporadica di CJD dalla placenta umana non è stata mai confermata ed è ritenuta improbabile.

⁽⁹⁾ Il PrP^{EST} è stato rilevato in ovini contagiati da scrapie con mastiti croniche, ma non in ovini contagiati senza mastiti [Ligios et al., 2005].

⁽¹⁰⁾ Studi su criceti contagiati per via orale da scrapie hanno dimostrato che la deposizione di PrP^{EST} sulla pelle era per lo più localizzata all'interno di piccole fibre nervose. Anche la pelle apicale «vellutata» delle corna di cervi contagiati da CWD sembra contenere PrP^{EST} e infettività [Angers et al., 2009].

⁽¹¹⁾ PrP^{EST} rilevato mediante immunocitochimica nella pelvi renale di ovini contagiati da scrapie [Siso et al., 2006]; e follicoli linfoidi nel tessuto connettivo adiacente alla pelvi renale in un cervo mulo contagiato da CWD [Fox et al., 2006].

- (12) Un unico midollo positivo in numerosi tentativi di trasmissione da bovini ai quali era stato somministrato per via orale cervello contagiato da ESB [Wells et al., 1999; Wells et al., 2005; Sohn et al., 2009].
- (13) Gli omogenati del muscolo non hanno trasmesso la malattia né ai primati a partire da muscoli di umani affetti da CJD sporadica né a bovini a partire da bovini contagiati da ESB. Peraltro, l'inoculazione intracerebrale di un omogenato di un muscolo semitendineo (inclusi elementi nervosi e linfatici) a partire da un'unica mucca con ESB clinica ha trasmesso la malattia a topi transgenici che sovraesprimono il PrP a un tasso indicativo delle tracce di infettività [Buschmann e Groschup, 2005]. Inoltre, studi recenti pubblicati o meno hanno rilevato la presenza di PrPEST nel muscolo scheletrico in modelli sperimentali di roditori affetti da scrapie e da vCJD [Beekes et al., 2005], nelle infezioni sperimentali e naturali di scrapie di ovini e caprini [Andreoletti et al., 2004], in ovini ai quali è stata somministrata oralmente la ESB [Andreoletti, dati non pubblicati], e in esseri umani con forme sporadiche, iatrogene e varianti di CJD [Glatzel et al., 2003; Kovacs et al., 2004; Peden et al., 2006]. Biodosaggi di muscolo in topi transgenici esprimono il PrP di cervidi hanno documentato l'infettività in cervi multi contagiati dalla CWD [Angers et al., 2006], ed esperimenti sono in corso per determinare se il PrPEST rilevabile in altre forme di EST è associato anch'esso all'infettività.
- (14) Nei bovini il biodosaggio dell'infettività nella lingua si è rivelato negativo, ma la presenza di infettività nelle tonsille palatali ha causato preoccupazione in merito all'eventuale tessuto tonsillare linguale alla base della lingua che può essere eliminato al momento del macello [Wells et al., 2005; EFSA, 2008]. Nei bovini contagiati da scrapie in modo naturale, 7 su 10 animali avevano il PrPEST rilevabile nella lingua [Casalone et al., 2005; Corona et al., 2006].
- (15) Limitato per lo più a regioni interessate dalla percezione sensoriale olfattiva.
- (16) Dal momento che un unico caso di CJD iatrogena è stato con sicurezza attribuito a un trapianto corneo tra centinaia di migliaia di beneficiari (è ritenuto probabile un altro caso e un altro soltanto possibile), la cornea è stata classificata come un tessuto a basso rischio; le prove effettuate sugli altri tessuti della camera anteriore (cristallino, umore acqueo, iride, congiuntiva) hanno dato risultati negativi sia per quanto riguarda la vMCJ che per quanto riguarda le altre EST nell'uomo e nessun dato epidemiologico ha consentito di associarli a una trasmissione iatrogena della malattia.
- (17) Un'ampia gamma di dati desunti da studi sull'infettività del sangue in modelli sperimentali di roditori affetti da EST è stata ampliata da studi recenti relativi all'infettività nel sangue di ovini con scrapie naturale e in ovini soggetti a trasfusione con sangue di bovini contagiati da ESB [Houston et al., 2008]; su cervi con CWD manifestatasi naturalmente [Mathiason et al., 2006]; e (da osservazioni epidemiologiche) nei globuli rossi (includere quantità significative di plasma e leucociti) di quattro donatori di sangue nella fase pre-clinica delle infezioni da vCJD [riesame in Brown, 2006; Hewitt et al., 2006]. La somministrazione di plasma, fattore VIII, è stata anch'essa potenzialmente interessata in un caso subclinico di vCJD in un paziente emofiliaco [Peden et al., 2010]. Non sembra che il sangue possa trasmettere la malattia da essere umani con qualsiasi forma di EST «classica» [Dorsey et al., 2009], o a partire da bovini con ESB (incluso sangue fetale di vitello). Alcuni laboratori che utilizzano metodi nuovi e altamente sensibili per rilevare il PrPEST stanno ottenendo successi in varie EST animali e umane. Molti di essi, peraltro, hanno riscontrato difficoltà nell'ottenere risultati riproducibili nel plasma e non è ancora chiaro se i risultati positivi presuppongano un potenziale di trasmissibilità della malattia sia a causa di falsi casi positivi o sia a causa di casi veramente positivi dovuti a concentrazioni sub-trasmissibili di PrPEST. A causa di tali considerazioni (e del fatto che non sono ancora disponibili dati in merito ad esperimenti in cieco di campioni di essere umani o di animali contagiati in modo naturale) il gruppo di esperti ha ritenuto che sia ancora troppo presto per valutare la validità di tali prove con sufficiente sicurezza da consentire una conclusione negativa o positiva.
- (18) Tra gli elementi che stabiliscono l'assenza di infettività nel latte figurano le osservazioni epidemiologiche temporo-spaziali che non hanno consentito di rilevare la trasmissione materna a vitelli allattati per lunghi periodi; le osservazioni cliniche su oltre 100 vitelli allattati da vacche infettate e che non hanno sviluppato l'ESB; e le osservazioni sperimentali del fatto che il latte provenienti da vacche contagiate allenate fino ad un'età superiore al periodo minimo di incubazione non hanno trasmesso la malattia ai topi ai quali è stato somministrato per via orale o intracerebrale [Middleton e Barlow, 1993; Taylor et al., 1995]. Inoltre, il PrPEST non è stato rilevato nel latte proveniente da bovini che incubavano l'ESB a seguito di somministrazione orale sperimentale [SEAC, 2005]. Peraltro, sono stati rilevati bassi livelli (μg to ng/L) di PrP normale nel latte di origine sia animale che umana [Franscini et al., 2006]. Il PrPEST è stato rilevato nelle ghiandole mammarie di ovini contagiati dalla scrapie con mastite cronica [Ligios et al., 2005], e ultimamente è stato confermato che il latte (contenente in alcuni casi anche colostro) proveniente da ovini contagiati dalla scrapie ha trasmesso la malattia ad animali sani [Konold et al., 2008; Lacroux et al., 2008].
- (19) Un inoculo misto di urina e di feci da cervi contagiati per via naturale da CWD non ha trasmesso la malattia durante un periodo di diciotto mesi di osservazione dopo l'inoculazione di cervi sani con un genotipo PRNP eterozigote (96 G/S) [Mathiason et al., 2006]. Peraltro, recenti biodosaggi in topi Tg hanno trasmesso la malattia sia dall'urina [Haley et al., 2009] sia dalle feci [Tamgüney et al., 2009]. Inoltre, topi con nefrite linfatica contagiati in via sperimentale dalla scrapie hanno eliminato sia il PrPEST che l'infettività nell'urina, quando biodosati in topi Tg [Seeger et al., 2005]. Sono stati inoltre rilevati livelli molto bassi di infettività nell'urina (e in reni istologicamente normali) di criceti contagiati in via sperimentale dalla scrapie [Gregori and Rohwer, 2007; Gonzalez-Romero et al., 2008]. Infine, in un modello sperimentale scrapie-criceto, il dosaggio orale ha provocato feci infettate quando biodosati in topi Tg con sovraespressione del PrP [Safar et al., 2008].
- (20) Embrioni ricavati da bovini affetti da ESB non hanno trasmesso la malattia ai topi, ma non è stata effettuata alcuna misurazione dell'infettività sui tessuti fetali dei vitelli diversi dal sangue (biodosaggio su topi negativo) [Fraser and Foster, 1994]. I vitelli nati da vacche cui sono stati inoculati embrioni provenienti da bovini affetti da ESB sono sopravvissuti per periodi di osservazione della durata massima di sette anni, e l'esame dei cervelli di madri non affette e dei loro vitelli non ha rivelato l'encefalopatia spongiforme né PrPEST [Wrathall et al., 2002].
- (21) Non sono stati tuttora confermati e sono quindi ritenuti improbabili casi sporadici di trasmissione dell'infettività MCJ a partire dal sangue del cordone ombelicale e dal colostro. Un biodosaggio da una mucca affetta da ESB in topi transgenici con sovraespressione del PrP bovino ha dato un risultato negativo [Buschmann and Groschup, 2005], e il PrPEST non è stato rilevato nel colostro di bovini che incubavano l'ESB a seguito di una somministrazione orale sperimentale [SEAC, 2005].