

Parole chiave:

emotrasfusione, virus,

HBV, HCV, HIV,

plasma

Mario Pezzella ¹, Rossella B. Castrica ²

EMOTRASFUSIONI E VIRUS TRASMISSIBILI

ABSTRACT

Gli autori presentano i principali virus trasmissibili per trasfusione di sangue quali i virus dell'immunodeficienza umana (HIV1-2) e i virus dell'epatite B e C (rispettivamente HBV e HCV).

La recente introduzione della metodologia della leucodeplezione ha apportato un importante contributo nella riduzione della quota di trasmissione di virus leucotropi come citomegalovirus (CMV), Epstein- Virus Barr (EBV), herpesvirus umani, virus della leucemia a cellule T umane (HTLV 1-2).

I progressi nella biologia molecolare hanno permesso di evidenziare che altri virus, considerati patogeni meno importanti quali i virus dell'epatite A e G (HAV, HGV), il Parvovirus umano B19, il Reovirus type 3 e il virus della Pseudorabbia possono essere trasmessi ai riceventi. Inoltre i virus emergenti con potenziale rischio zoonotico potrebbero svolgere un ruolo non marginale nella diffusione di infezione.

Molta attenzione viene oggi prestata alle patologie dovute ai virus emergenti quali quello dell'epatite E (HEV), gli hantavirus, il virus West Nile Disease ed il virus della febbre emorragica di Crimea-Congo.

Gli autori hanno seguito le procedure di validazione in linea con le norme europee della Agenzia Europea dei Farmaci (EMA).

INTRODUZIONE

Il plasma umano contiene numerose proteine di grande importanza medica che vengono ottenute con la tecnica di frazionamento alcolico ideata da Edwin Cohn e colleghi.

Sebbene l'uso terapeutico della trasfusione di sangue risalga all'inizio del XX secolo, negli anni Quaranta del XX secolo la tecnica del frazionamento del plasma ha consentito l'uso di un'ampia varietà di prodotti di indiscusso valore terapeutico.

L'idea di impiegare gli anticorpi prodotti da un individuo per proteggere un altro risale al 1888 quando i francesi Richet Charles e Héricourt Jules la prospettarono a chiare lettere discutendo i risultati di una loro ricerca sullo *Staphylococcus pyosepticus* intrapresa per conoscere meglio le caratteristiche di questo batterio e per imparare ad evitarne gli effetti patogeni. Successivamente descrissero il principio della sieroterapia e nel 1895 fecero i primi tentativi di combattere il cancro.

I protocolli di validazione virale utilizzati per la sicurezza dei prodotti biologici, sono contenuti nelle linee guida del Comitato per i medicinali per uso umano (CHMP) della European Medicines Agency (EMA) che ha sostituito l'ex comitato per le specialità medicinali (CPMP) nel maggio del 2004.

I prodotti del sangue devono essere sottoposti a procedure autorizzative e di validazione.

Il Parlamento di Strasburgo ha approvato il 12 giugno 2002 una direttiva che detta standard uniformi di qualità e sicurezza per i centri trasfusionali e garantisce la libera circolazione del sangue e dei donatori.

Per tutti i Paesi membri la donazione è volontaria e non retribuita e le spese per la produzione e la distribuzione del sangue e dei suoi prodotti, comprese le cellule staminali emopoietiche, non sono addebitabili ai riceventi.

La direttiva prevede standard elevati di qualità e sicurezza per l'adozione di tutte le misure precauzionali possibili dettate dai progressi scientifici in materia di ricerca, inattivazione e di eliminazione di agenti patogeni trasmissibili al fine di salvaguardare la salute pubblica.

Gli Stati membri assicurano che le attività relative alla raccolta e al controllo del sangue umano e dei suoi componenti siano effettuate unicamente da centri ematologici che abbiano ottenuto una designazione, un'autorizzazione, un accreditamento o una licenza da parte delle autorità competenti (Direttiva 2002/98/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 27 gennaio 2003).

In Italia le regioni adottano tutte le misure atte a garantire la rintracciabilità delle unità di sangue intero, di emocomponenti ricavati dal frazionamento del sangue con mezzi semplici o con aferesi e dei farmaci emoderivati costituiti da specialità medicinali ottenuti mediante processo di lavorazione industriale secondo precise modalità stabilite dalla legge quali l'albumina, le gammaglobuline, i concentrati antitrombina III, i concentrati di fattore VII, VIII, IX e i concentrati di complesso protrombinico.

Nei pazienti adulti viene giustificata la trasfusione di emazie concentrate necessarie per aumentare rapidamente l'apporto di ossigeno ai tessuti dal valore soglia di Hb di 6-7 g/dl a 9-10 g/dl nei casi di marcata diminuzione della ossigenazione tissutale, mentre i concentrati piastrinici sono indicati per il trattamento (e la profilassi) delle emorragie dovute a carenza quantitativa o qualitativa delle piastrine.

Le strutture trasfusionali adottano adeguati sistemi di registrazione e di archiviazione che consentono l'identificazione univoca dei donatori e delle donazioni di sangue e dei relativi prodotti fino alla destinazione finale stabilendo che la documentazione trasfusionale va conservata a tempo illimitato (Legge 21 ottobre 2005 n. 219).

I donatori per idoneità alla donazione devono essere sottoposti ai seguenti esami obbligatori ad ogni donazione riportati nel decreto 2 novembre 2015 (GU n. 300 del 28-12-2015) dal titolo "Disposizioni relativi ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti": esame emocromocitometrico completo, HBsAg, anticorpi anti-HCV, test sierologico per la ricerca combinata di anticorpo anti-HIV 1-2 e antigene HIV 1-2, anticorpi anti-Treponema Pallidum (TP) con metodo immunometrico, HCV NAT, HBV NAT, HIV1 NAT.

Le attività di controllo della sicurezza da contaminazione virale dei plasmaderivati sono basate sulle selezione dei donatori di sangue e delle singole donazioni tramite valutazione delle indagini virologiche svolte sulle donazioni di sangue e sui *plasma*.

La selezione del materiale di partenza rappresenta il primo approccio alla sicurezza da contaminazione virale seguito dalla valutazione del processo di produzione necessario ad eliminare un ampio spettro di virus, principalmente virus noti che possono essere presenti per il mancato rilevamento nella fase di *screening* delle donazioni di sangue nonostante l'impiego di sistemi diagnostici sottoposti a procedure autorizzative e/o di validazione.

Non è comunque trascurabile la possibilità della presenza di virus sconosciuti nuovi o emergenti in fase di viremia.

Infine viene controllato il prodotto finale che prevede la ricerca di virus sia negli intermedi di produzione che nel prodotto finale.

La validazione virale viene eseguita attraverso studi sperimentali che comportano la creazione di un modello produttivo su scala ridotta idoneo a creare le condizioni di produzione in modo accurato su scala industriale.

La prima fase consiste nella rimozione virale alla quale seguono i metodi di inattivazione mediante trattamento con solvente/detergente (S/D).

Questa fase operativa deve essere calibrata per un ampio range di virus a DNA e RNA provvisti e

sprovvisi di “mantello” con differenti caratteristiche chimico-fisiche.

Nel caso in cui non sia disponibile uno specifico sistema di titolazione devono essere utilizzati virus che coprano l'intero range di caratteristiche con i virus potenzialmente contaminanti per cui siano disponibili saggi di infettività standardizzati, sensibili e di relativamente semplice esecuzione.

Vengono quindi inclusi, sia virus a RNA che a DNA provvisti e sprovvisti del “mantello”.

La convalida dei processi di inattivazione/rimozione virale prevede che il procedimento inattivi o rimuova contaminanti virali eventualmente presenti con aggiunta di virus modello a concentrazione nota in varie fasi di produzione.

I virus modello, scelti tra quelli confrontabili per caratteristiche simili ai virus che potenzialmente potrebbero contaminare il prodotto, agiscono da indicatore su cui viene calcolato il fattore di riduzione basato sul controllo del titolo virale.

I più importanti virus trasmissibili per trasfusione di sangue sono i virus dell'immunodeficienza umana (HIV 1 e 2), i virus dell'epatite A, B, C, E. (rispettivamente HAV, HBV, HCV, HEV) e il Parvovirus umano B19.

La validazione prevede l'aggiunta di una loro quantità nota all'inizio del processo e valutata la riduzione del loro titolo virale nelle varie fasi operative direttamente dipendente dalla efficacia del processo di validazione.

Virus infettivi senza “mantello” sono stati rilevati in alcuni medicinali derivati dal plasma durante gli anni '90 del secolo scorso e l'inizio degli anni 2000. Nuovi sviluppi del processo di validazione sono stati dedicati alla riduzione dei virus senza “mantello” come l'epatite A (HAV) e il parvovirus umano B19.

La recente introduzione della metodologia della leucodeplezione ha apportato un importante contributo a diminuire la quota di trasmissione di virus leucotropi come il Citomegalovirus (CMV), l'Epstein-Virus Barr (EBV), gli Herpesvirus umani e virus della leucemia a cellule T umane (HTLV 1-2).

Nel caso di virus in cui non esiste un sistema di propagazione in colture cellulari *in vitro* viene

utilizzato in sostituzione un virus modello per cui sono disponibili saggi standardizzati di infettività efficienti e sensibili.

Per tutti i medicinali derivati dal plasma, le misure efficaci di inattivazione/rimozione di una vasta gamma di virus con diverse caratteristiche rappresentano un obiettivo fondamentale.

A tale scopo vengono utilizzati due distinti trattamenti, di cui uno efficace contro i virus provvisti di “mantello” e l'altro contro i virus sprovvisti di “mantello”, che si completano a vicenda nel loro modo di agire, in modo tale che qualsiasi virus che sopravviva al primo venga inattivato/rimosso al secondo. Non è un compito semplice attuare fasi che si completino a vicenda e che siano efficaci contro una vasta gamma di diversi virus che tendono a distinguersi tra quelli suscettibili alle procedure adottate di inattivazione/rimozione e quelli resistenti.

La situazione viene ulteriormente complicata dalla eventuale presenza di agenti infettivi nuovi o sconosciuti. Inoltre è da dimostrare la rimozione di componenti estranei indesiderati come i residui di sostanze chimiche utilizzate o derivate dalle metodiche di frazionamento/purificazione e sostanze presenti in natura che possono essere pericolose, come i gruppi sanguigni e fattori di coagulazione attivati.

I metodi di inattivazione dei virus come la pastorizzazione che inattiva sia virus con “mantello” che senza “mantello”, il trattamento con solvente/detergente (S/D) e la nanofiltrazione eseguita con filtri di diversa porosità efficace anch'essa nella rimozione di virus, sono integrati nei processi produttivi delle proteine di plasma umano. La letteratura scientifica puntualizza i limiti della nanofiltrazione che presenta alcune importanti limitazioni come l'adesione non specifica a un gran numero di piastrine, di cellule rosse insieme con leucociti.

Tuttavia questa procedura non garantisce l'assenza di virus nel filtrato e deve quindi essere considerata come un metodo complementare da associare ad altre procedure per l'inattivazione/rimozione virale ⁽¹⁾.

I prodotti ottenuti da plasma umano possono comunque contenere agenti infettivi ed il rischio che possano trasmetterli ai riceventi viene ridotto sottoponendo a screening i donatori di plasma ma, nonostante queste misure, tali prodotti, secondo le informazioni riportate nella banca dati americana *Drugs*, possono ancora trasmettere malattie “*despite these measures such products can still potentially transmit disease*”.

La banca dati americana *Drugs* raccoglie informazioni provenienti da tre fonti informative mediche indipendenti: Physicians’ Desk Reference, Cerner Multum e Thomson Micromedex.

Le informazioni fornite da queste fonti sono riportate nel database in modo completo.

Drugs.com fornisce notizie sui farmaci in commercio e informazioni mediche su oltre 24.000 sostanze e dispositivi medici, comprese le informazioni sugli effetti avversi e le interazioni tra farmaci nonché le formule di struttura e le immagini dei farmaci in commercio (Biblioteca Digitale Padova)⁽²⁾.

Il plasma proveniente da migliaia di donatori viene sottoposto a procedure di rimozione / inattivazione progettate per rimuovere i virus infettivi contaminanti con le tecniche di frazionamento quali la precipitazione alcolica e la nanofiltrazione seguite da quella di inattivazione della infettività virale con il trattamento con solvente / detergente particolarmente efficace nei confronti di virus provvisti di “mantello” ma sostanzialmente inefficace nei confronti di virus sprovvisti di “mantello”.

Anche il trattamento al calore è particolarmente efficace solo nei confronti di virus con “mantello”.

La preparazione di emoderivati viene eseguita partendo da grandi pool di plasma umano che consentono di disporre di preparati anticorpali a titolo elevato ed ampio spettro di azione anche se è elevata la probabilità che una donazione nel pool possa essere infetta e quindi causa di diffusione dei contagi.

Le immunoglobuline per uso i.v., a differenza di quelle per uso intramuscolo, sono risultate in grado di trasmettere l’infezione di virus epatitici⁽³⁾.

La capacità di trasmissione virale è ben riconosciuta e un singolo lotto di un prodotto derivato dal plasma, anche se contaminato da una singola donazione, può trasmettere malattie virali a un gran numero di destinatari.

Il documento tecnico relativo “Plasma Master File” riporta le principali informazioni relative alla raccolta, ai risultati dei tests utilizzati, alla conservazione ed alla elaborazione dei dati. Dall’anno 2000 al 2014 in Italia è stata rilevata in vari casi positività ai marcatori virali in pool composti con unità di plasma prodotte dai Servizi Trasfusionali nazionali.

E’ stato osservato che per ogni plasma pool risultato positivo almeno una unità di plasma, certificata come negativa, era confluita nel medesimo pool. Tale situazione si è verificata in otto casi nel periodo di tempo 2008-2014 e in particolare in cinque concentrati nel periodo giugno 2013-maggio 2014⁽⁴⁾.

I metodi di inattivazione virale praticati non rispondono appieno alle esigenze di un prodotto sicuro pur avendo questi metodi significativamente aumentato la sicurezza degli emoderivati per quanto riguarda la trasmissione di virus.

Gli esperimenti condotti da J. Hilfenhaus nel 1997 su campioni contenenti quantità di riferimento note di HBV DNA (105 Eurohep units per ml) hanno dimostrato che la pastorizzazione e il trattamento con solvente/detergente mantengono il titolo di HBV DNA sostanzialmente invariato rispetto al materiale di partenza stando a dimostrare che non hanno alcun effetto sulla quantità del genoma virale dosato con l’uso della tecnica Nucleic Acid Testing (NAT).

Il trattamento con solvente/detergente (S/D) distrugge il rivestimento costituito da interazione lipidi-proteine del virus HBV ma la struttura virale è mantenuta integra ed il DNA genomico viene efficacemente protetto dalle proteine del *core*⁽⁵⁾.

La valutazione della sicurezza virale degli emoderivati non può essere basata solamente sul controllo del prodotto finito sia attraverso il dosaggio della viremia che attraverso il dosaggio del DNA, ma cosa più importante e fondamentale, deve essere basata sulla qualità del materiale di partenza e sui risultati convalidati relativi all’ inattivazione e alla eliminazione del virus raggiunti mediante il processo produttivo.

Questa osservazione è in linea con quanto raccomandato dallo Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: *Immunization of adults*.

Anche un risultato negativo della PCR non dimostra in modo inequivocabile che la preparazione testata sia totalmente priva di qualsiasi virione, infettiva o meno, poiché tale risultato deve essere correlato alle dimensioni del campione di prova e alla sensibilità del test utilizzato.

I miglioramenti nella tecnologia di purificazione delle proteine e separazione molecolare negli ultimi anni hanno reso disponibile un'ampia varietà di prodotti. Il riconoscimento a metà degli anni 80' del Novecento che i prodotti derivati dal plasma, in particolare i concentrati dei fattori di coagulazione, avevano causato una trasmissione diffusa di HIV e epatite non-A non-B (principalmente HCV) ha comportato importanti cambiamenti nei processi produttivi, con l'introduzione di nuove metodologie per inattivare o rimuovere questi e altri virus trasmessi dal sangue.

Episodi occasionali di trasmissione di virus trasmessi dal sangue hanno indotto ad usare ulteriori misure atte a garantire la sicurezza virologica degli emoderivati. In rari casi è stato dimostrato che i medicinali derivati dal plasma umano trasmettono virus anche se il materiale di partenza è stato controllato per la contaminazione virale in conformità con procedure all'avanguardia. Ciò è dovuto alla natura del materiale di partenza, che viene ottenuto da un gruppo di donatori umani eterogenei che non possono essere singolarmente caratterizzati a fondo.

La sierologia del plasma non è in grado di rilevare tutte le singole donazioni contaminate che possono essere sfuggite allo screening. Pazienti con infezione da epatite B occulta o asintomatica e bassi livelli di HBsAg possono sfuggire al rilevamento dopo la diluizione in un pool di produzione poiché i pool plasmatici possono contenere anticorpi anti-HBsAg, prevalentemente da vaccinazioni, che possono provocare la formazione di complessi immuni HBsAg/anti-HBsAg capaci di influenzare il limite di rilevazione. In ogni caso il controllo della qualità dei preparati inizia con l'identificazione e la selezione dei donatori sulla base della valutazione della storia

clinica, tenendo anche in considerazione i dati di sorveglianza epidemiologica della popolazione di appartenenza ⁽⁶⁾.

Il processo produttivo degli emoderivati prevede due distinte classi di interventi, quali la rimozione e la inattivazione dei virus patogeni e l'utilizzo di due distinte fasi di inattivazione virale di cui una efficace contro i virus privi di mantello.

La European Medicines Agency ha pubblicato delle linee-guida sui metodi standardizzati di purificazione dei farmaci derivati dal plasma umano dal titolo "Guideline on plasma-derived medicinal products" cui tutti i paesi europei sono invitati ad attenersi ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.



PROCESSI DI INATTIVAZIONE VIRALE

I più importanti processi di inattivazione virale sono di seguito illustrati.

PASTORIZZAZIONE

La pastorizzazione è il metodo della Farmacopea Ufficiale Italiana per la separazione dell'albumina effettuata in condizioni controllate di pH, di forza ionica e di temperatura in modo che nel prodotto finale almeno il 95% delle proteine totali sia costituito da albumina. Il riscaldamento termico in fase liquida a 60°C per 10 ore nel contenitore finale idoneo ad inattivare un'ampia gamma di virus di diverse caratteristiche fisico-chimiche con e senza mantello viene utilizzato per la preparazione di numerosi medicinali derivati dal plasma.

Considerando che gli attuali pool di plasma per il frazionamento possono essere composti da più di 1000 donazioni c'è il rischio che una qualche donazione possa essere infetta.

La pastorizzazione è un trattamento di inattivazione efficace per virus con "mantello" e per alcuni virus senza "mantello" dipendente dalla composizione della soluzione, dalla temperatura e dal tempo di incubazione.

L'uso di agenti stabilizzanti al calore quali il sucrosio ed il sorbitolo può essere necessario per proteggere le proteine e ridurre al minimo la formazione di neoantigeni.

Il loro impiego richiede particolare attenzione per evitare che possano anche proteggere virus infettanti dall'inattivazione.

Alla fine del trattamento gli agenti stabilizzanti vengono rimossi con la nanofiltrazione.

La capacità di inattivazione del processo di fabbricazione determinata sperimentalmente è supportata da dati epidemiologici.

Nonostante l'uso comune della pastorizzazione, ad oggi, non vi è alcuna pubblicazione scientifica esauriente sulla sua efficacia relativa all'inattivazione di un'ampia gamma di virus in vari prodotti derivati dal plasma.

Con un'adeguata selezione di donatori, di donazioni e ulteriori fasi di controllo di virus potenzialmente presenti nel materiale di partenza, i prodotti derivati dal plasma pastorizzati pur avendo un elevato margine di sicurezza, possono ancora trasmettere infezioni virali ⁽⁹⁾.

RISCALDAMENTO DI PRODOTTI LIOFILIZZATI

L'efficacia dell'inattivazione del virus può variare in base alle caratteristiche del liofilizzato e le condizioni di riscaldamento.

I limiti superiore e inferiore dell'umidità residua sono impostati in base a studi di validazione, così come gli studi di integrità delle proteine e studi di formazione aggregati.

Dove tale trattamento viene applicato al prodotto nei suoi contenitori finali, la variazione di umidità residua deve essere mantenuta nei limiti stabiliti. L'umidità residua è un parametro critico particolare e deve essere preferibilmente misurato su ciascuna fiala con metodi non distruttivi.

La temperatura e la durata del riscaldamento devono essere monitorate durante tutte le fasi del processo.

TRATTAMENTO SOLVENTE / DETERGENTE

Il trattamento con il solvente tri-n-butyl-fosfato (TNBP) combinato con il detergente non ionico Triton X-100 o Il Tween 80 è una procedura consolidata per l'inattivazione del virus con "mantello", quelli senza "mantello" non vengono inattivati da questo processo. L'esecuzione di tale trattamento prevede l'uso di alcune cautele operative.

Prima dell'aggiunta del solvente/detergente, le soluzioni, mediante filtrazione, vengono private di

aggregati grossolani che potrebbero contenere virus proteggendoli dal trattamento. I controlli durante il trattamento vengono eseguiti a confermare le quantità corrette di solvente e detergente.

La convalida fisica deve dimostrare che la miscelazione dei componenti sia omogenea e che la temperatura stabilita sia controllata e uniforme nella soluzione per tutta la durata del tempo di incubazione poiché un eccessivo contenuto di lipidi potrebbe influenzare l'efficacia dell'inattivazione.

Inoltre il trattamento solvente/detergente potrebbe disgregare eventuali aggregati e consentire la rimozione di più virus senza "mantello" attraverso la successiva fase di filtraggio.

Viene inoltre prestata particolare attenzione al mantenimento dell'integrità dei componenti della derivata plasmatica e dell'efficacia clinica, al potenziale di formazione di neoantigeni, alla possibilità di aumento della trombogenicità da fattori di coagulazione attivati e possibilità di residui tossici da sostanze chimiche utilizzate durante il processo oltre che alla sicurezza virologica.

I livelli residui di solvente e di detergente vengono minimizzati dalla lavorazione e attentamente monitorati nel prodotto finale ⁽¹⁰⁾.

pH ACIDO

Un basso valore di pH, circa 4, può essere efficace nella preparazione delle gammaglobuline per inattivare i virus con mantello e virus senza "mantello".

In alcuni studi il parvovirus B19 è stato inattivato a differenza dei parvovirus animali e dell'HAV.

Per i virus sia con "mantello" che senza "mantello", i fattori di riduzione dipendono principalmente dalle condizioni operative quali il valore del pH, la durata e la temperatura del trattamento, la composizione della soluzione e dal ceppo virale.

I processi di rimozione più usati sono:

PRECIPITAZIONE CON ETANOLO

Il frazionamento di etanolo può contribuire alla sicurezza del virus dell'albumina e delle immunoglobuline mediante la rimozione dei virus infettanti piuttosto che la loro inattivazione.

In effetti, l'effetto disinfettante di etanolo a basso

valore di pH si verifica per lo più a temperatura ambiente, mentre il frazionamento del plasma viene effettuato a un livello di bassa temperatura per evitare la denaturazione delle proteine.

Dove il frazionamento differenziale dei componenti del plasma si verifica durante le fasi di precipitazione, i virus infettanti vengono rimossi con la frazione scartata contenente le proteine precipitate che possono essere separate mediante centrifugazione o per filtrazione.

FILTRAZIONE ANTI-VIRUS

Potrebbero esserci delle difficoltà nel rimuovere i virus più piccoli mediante filtrazione pur mantenendo una resa soddisfacente del prodotto, specialmente per componenti ad alto peso molecolare come il Fattore VIII.

Questo evento viene minimizzato dalla scelta adeguata del materiale filtrante mentre l'attivazione dei fattori della coagulazione causata da alcuni tipi di filtri viene monitorata prima e dopo la filtrazione.

La modalità di azione dei filtri dipende da parametri critici quali il volume per area del filtro, la forza ionica, il pH, la portata, la pressione ed il carico proteico. Inoltre la performance dei filtri utilizzati negli studi di convalida viene confrontata con quella dei filtri utilizzati nella produzione routinaria.

La formazione di aggregati di virus può influire sul livello di rimozione del virus nella filtrazione.

In particolare nella esecuzione di studi di validazione è necessario tenere conto che lo stato di aggregazione formatosi in laboratorio può differire da quello presente nel plasma.

NANOFILTRAZIONE

Può essere eseguita utilizzando filtri con pori differenti. La nanofiltrazione è un metodo efficace nella rimozione di virus con "mantello" e senza "mantello". Sembra efficace nella rimozione anche di proteine prioniche.

La nanofiltrazione è un metodo di filtrazione che dipende dalla permeabilità della membrana ed è attualmente la migliore alternativa per rimuovere alcuni ioni multivalenti, batteri, solidi sospesi e virus.

Questa caratteristica rende la nanofiltrazione quale

metodo preferito per la separazione dei composti, motivo per cui è utilizzata nel settore farmacologico in cui vengono preferibilmente utilizzate membrane in lamina piatta, preparate in materiale di polipropilene per una maggiore resistenza.

L'unità di misura utilizzata per condurre la misurazione è il Dalton, riferita all'unità di massa atomica poiché le membrane di nanofiltrazione sono valutate in base al peso molecolare piuttosto che al diametro dei pori. L'applicazione di una o più di queste metodiche ha significativamente aumentato la sicurezza dei prodotti attualmente disponibili per quanto riguarda la trasmissione di virus ^{(7) (8)}.



VALIDAZIONE VIRALE

La validazione virale viene sperimentalmente eseguita in laboratorio in piccola scala utilizzando virus modello.

I virus sono denominati e inseriti in un sistema tassonomico secondo la classificazione di Baltimore del 1971, che suddivide i virus in sette classi in base alla natura e polarità dei genomi, se DNA o RNA, a singolo filamento o a doppio filamento, a senso positivo (+) o negativo (-) e dal loro tipo di replicazione.

I vari gruppi di virus sono suddivisi in famiglie.

Le classi sono indicate con numeri romani.

- **Virus dell'epatite B (HBV)**

Attualmente non esiste un sistema di test pratico per la convalida del virus dell'epatite B che non può essere coltivato in coltura cellulare e non può essere titolato *in vitro*. I modelli di coltura cellulare per il virus dell'epatite B rimangono il cardine per lo screening e la verifica dell'efficacia degli agenti antiepatite B.

Nella "Note for Guidance on Plasma Derived Medicinal Products" del luglio 2011, il "Committee for Medicinal Products for Human Use" (CHMP) ha confermato l'assenza di un test pratico per la convalida dei metodi di inattivazione virale ed ha proposto l'utilizzazione, come virus surrogato, del modello animale costituito dal virus Duckhepatitis B virus (DHBV) che non può essere mantenuto in colture cellulari *in vitro* ma può essere sviluppato su epatociti da anatra o cellule di anatra primaria.

Attualmente la scelta di un modello idoneo per HBV non ha ancora trovato riscontro per cui il virus dell'epatite B dell'oca (DHBV) può essere utilizzato come modello dell'HBV umana.

Tale virus richiede l'uso del suo ospite naturale (anatra o anatra primaria) per la titolazione, di conseguenza non vi è alcun requisito generale per includere DHBV nel pannello dei virus.

Le linee guida per la convalida sono state sviluppate dalle autorità europee, che richiedono ai produttori di emoderivati studi per dimostrare la capacità, l'affidabilità e l'efficacia dei processi di produzione idonei a disattivare e/o rimuovere i virus potenzialmente presenti nei *plasma pool* iniziali (11).

- **Virus HIV 1-2**

Il virus dell'immunodeficienza umana, tipo 1 (HIV-1), è stato scelto come virus rilevante per i prodotti del sangue poiché inattivato con il trattamento detergente/solvente (SD con reagenti come tri-n-butyl fosfato (TNBP) e Triton X-100 o Polisorbato 80.

La pastorizzazione a 60°C per 10 ore inattiva in modo affidabile l'HIV in presenza di stabilizzanti poiché è sensibile al calore ed ai detergenti.

Non è necessario effettuare ulteriori studi sull'HIV-2 in quanto influenzato in modo simile nella procedura di inattivazione.

- **Virus dell'epatite C (HCV)**

La caratterizzazione biochimica dell'HCV classifica il virus dell'epatite C nei Flaviviridae relativi sia ai pestivirus che ai flavivirus.

Il virus HCV è stato scoperto nel 1989 e solamente nel 2005 è stata trovata una linea cellulare di un carcinoma derivato da epatociti ben differenziata prelevata da un tumore al fegato in un maschio giapponese.

La linea cellulare coltivata in vitro denominata Huh7 è stata di importanza fondamentale per consentire all'HCV di poter essere titolato in vitro.

I sistemi di coltura cellulare hanno facilitato lo sviluppo di efficaci farmaci antivirali ad azione diretta contro l'HCV (12).

- **Virus dell'epatite E**

I virus *calicivirus felino* (FCV), il *norovirus murino* (MNV) ed il *virus della trota tagliagole* (CTV) sono stati utilizzati per convalidare i metodi di inattivazione dell'HEV.

Sono stati trovati sistemi di coltura cellulare adatti allo scopo di studiare l'inattivazione del virus. Ad ogni modo l'esperienza acquisita è ancora limitata e non definitiva per concludere quanto siano accurati questi modelli virali nell'inattivazione dell'HEV.

I dati disponibili suggeriscono che nessun virus modello singolo o preparazione di virus singoli sembra appropriato per tutte le diverse fasi di produzione che possono contribuire alla inattivazione dell'HEV (13).

- **Herpes umano**

Il virus Pseudorabbia (PRV) è stato scelto per modellare i virus dell'herpes umano e altri grandi virus con genoma DNA provvisti di mantello.

- **Virus senza "mantello"**

Il Reo virus type 3 è stato scelto per modellare i virus senza mantello per la sua resistenza all'inattivazione fisica e chimica.

- **Fattori VIII e IX della coagulazione**

La trasmissione dell'epatite A è stata associata a determinati fattori della coagulazione per i quali HAV viene considerato utilizzabile in studi di validazione.



VIRUS DI RILEVANZA TRASFUSIONALE

HBV: VIRUS DELL'EPATITE B

L'epatite B è un problema di sanità pubblica globale. Secondo il rapporto dell'OMS del 1917 più di due miliardi di persone sono state esposte al virus dell'epatite B.

Il portale dell'epidemiologia per la sanità pubblica dell'I.S.S., riporta che nel mondo, sono circa 257 milioni, ovvero il 3.5% della popolazione, i portatori cronici che hanno un'infezione da epatite B. Il virus HBV, appartenente alla famiglia degli *Hepadnaviridae* caratterizzato da uno spiccato epatotropismo, ha un genoma a DNA parzialmente bicatenario di 42 nm circolare con struttura a doppia elica incompleta (di 3200 paia di basi) costituito

da un filamento lungo L di senso negativo e di un filamento corto S di senso positivo di lunghezza variabile per il 10-50% racchiuso in un capsidico icosaedrico ed è classificato in 9 genotipi (A-I) sulla base di una divergenza nucleotidica dell'8% circa lungo la sequenza dell'intero genoma.

Presenta vari antigeni, di cui il primo è denominato HBsAg, antigene di superficie dell'epatite B, sintetizzato nel citoplasma delle cellule epatiche; un secondo antigene, denominato HBcAg non rilevabile libero nel plasma ma nei nuclei delle cellule epatiche ed un terzo antigene, denominato HBeAg, presente nel plasma e strettamente correlato alla presenza di particelle virali complete.

Quando sono presenti, la persona infetta risponde con la formazione di anticorpi specifici, anti-HBs, anti-HBe, anti-HBc. L'organo bersaglio di elezione dell'HBV è costituito dalla cellula epatica.

Una volta penetrato nella cellula con un meccanismo di endocitosi la particella virale inizia un processo di scapsidamento e viene traslocata verso il nucleo mediante un segnale di localizzazione nucleare presente sulla proteina capsidica dando inizio ad una sequenza di eventi che porta alla integrazione dell'HBVDNA nel genoma della cellula ospite.

Viene quindi completata la sintesi del filamento S per opera degli enzimi presenti nella cellula con formazione di una catena completa di DNA bicatenario circolare chiusa covalentemente denominata cccDNA (covalently closed circular DNA) ad opera delle topoisomerasi nucleari e successiva trascrizione di un'elica del DNA circolare in RNA a singola elica per azione delle polimerasi presenti nella cellula ospite formando il pregenoma a RNA utilizzato come modello per la trascrittasi inversa.

Lo stesso RNA funge anche da messaggero per la sintesi delle proteine specifiche del virus.

Segue la sintesi della prima catena del DNA mediante trascrittasi inversa associata al core del virus cui segue la sintesi della seconda catena del DNA copiando la prima. Si ottiene il genoma del virus che verrà poi liberato dalla cellula.

La risposta immunitaria vede infatti coinvolti i

linfociti B, i linfociti T e i linfociti natural killer (NK) oltre alle cellule dendritiche.

Entrambe le componenti sia umorale sia cellulare della risposta immunitaria sono necessarie per la eliminazione di HBV.

Partecipano in modo significativo anche le citochine che vengono rilasciate dalle cellule attivate dal virus, le interleukine, il Tumor Necrosis Factor e Interferon α e γ (TNF α e INT α e γ).

Il TNF α (tumor necrosis factor α) è una citochina pro infiammatoria e immunoregolatoria prodotta principalmente da macrofagi e cellule dendritiche il cui ruolo principale consiste nella regolazione delle cellule della linea monocito-macrofagica e natural killer oltre ad essere un importante regolatore dell'espressione di altre citochine come IL-1 e IL-6.

La *immunosoppressione* può indurre la ripresa dell'infezione da HBV, della citolisi e della carica virale in alcune particolari situazioni cliniche.

In una percentuale ampiamente variabile dal 3 al 50%, di pazienti clinicamente guariti da una pregressa epatite B, trattati con farmaci immunosoppressori per sopraggiunta malattia onco-ematologica, malattia reumatologica o autoimmune, può verificarsi una riattivazione della malattia con ricomparsa dell'HBsAg, negativizzazione dell'anticorpo anti-HBs ed aumento delle transaminasi ALT e AST.

Una analoga situazione è riferita ad un numero non trascurabile sia di pazienti affetti da epatite cronica lieve, asintomatici, HBsAg e anti-HBe positivi con HBV DNA assente o comunque inferiore a 2000 UI/ml e transaminasi normali che di pazienti affetti da infezione occulta (OBI) che, se sottoposti a chemioterapia antitumorale per sopraggiunta malattia oncoematologica, possono presentare un aggravamento della malattia epatica con un aumento significativo della viremia. In tali situazioni sotto il profilo clinico possono manifestarsi quadri di gravità variabile da forme asintomatiche a epatite fulminante.

Il trattamento di pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con farmaci interferenti con TNF può aumentare il rischio di riattivazione di una pregressa infezione da *Mycobacterium tuberculosis* o di una epatite virale da HCV o HBV.

Il danno epatico è provocato dalla risposta immunitaria cellulo-mediata diretta verso gli antigeni del nucleocapside virale HBcAg e HBeAg, che sono espressi sulla superficie degli epatociti infettati insieme agli antigeni maggiori di istocompatibilità di classe I (HLA-I).

Il meccanismo che porta alla necrosi dell'epatocita è dovuto alla replicazione del virus nell'epatocita, al suo passaggio in circolo e al riconoscimento dai linfociti T che si moltiplicano. Questi riconoscono gli antigeni sulla superficie degli epatociti con cui reagiscono e provocano la necrosi degli epatociti sulla cui superficie i linfociti sensibilizzati hanno captato l'antigene.

La differente capacità di risposta immunitaria assieme all'esistenza di ceppi mutanti del virus a diverso grado di patogenicità ed al possibile intervento di cofattori esogeni, condizionano la capacità a risolvere l'infezione.

La terapia immunosoppressiva, indispensabile in alcune situazioni cliniche, si contraddistingue da quella ad alto rischio basata sull'impiego di farmaci ad elevata concentrazione e per lunghi periodi di tempo e quella a basso rischio basata sull'impiego di steroidi a basso dosaggio ⁽¹⁴⁾.

Il concetto di guarigione nel caso di infezione da HBV è un concetto relativo all'efficienza dei meccanismi di difesa nei confronti dell'infezione messi in atto del sistema immunitario dell'ospite. La reale e completa eliminazione del virus dall'organismo, la *restitutio ad integrum*, sembra essere un evento raro dopo la guarigione clinica e probabilmente non viene mai raggiunta in quanto è dimostrata la *persistenza del genoma virale* dell'HBV in forma episomale per cui il DNA virale persiste integrato nel cromosoma della cellula epatocitaria per tutta la vita.

Il virus HBV integrato.

Il genoma del virus HBV integrato è stato rilevato nella maggioranza dei carcinomi epatocellulari associati all'HBV.

Nonostante la disponibilità di un vaccino prodotto mediante la tecnica del DNA ricombinante, privo di particelle virali, oltre ad efficaci farmaci antivirali, quali gli analoghi nucleosidici (Lamivudina, Emtricitabina, Telbivudina ed Entecavir) e gli

analoghi nucleotidici (Tenofovir e Adefovir), costituisce un grave problema di salute pubblica.

La guarigione clinica da epatite HBV si ottiene solamente in pazienti immunocompetenti con risposta immunitaria normale. Pazienti con risposta immunitaria non efficiente sviluppano una epatite cronica con segni istologici di attività mentre i pazienti con risposta immunitaria assente sviluppano la condizione di portatore cronico inattivo. L'epatite fulminante, la forma più grave di epatite virale da HBV, è dovuta ad una necrosi massiva degli epatociti causata da una eccessiva risposta immunitaria che può avere un esito letale.

L'infezione con il virus dell'epatite B (HBV) è uno dei più importanti fattori di rischio per il carcinoma epatocellulare (HCC), la seconda forma di cancro più letale. La progressione verso il cancro primitivo del fegato è stata dimostrata dipendere dal virus HBV che è in grado di conservare intatto il meccanismo potenziale di oncogenesi anche in pazienti HBsAg negativi ⁽³⁾.

Nel fegato può essere presente anche la coinfezione con il virus Delta (HDV) che condivide gli stessi recettori sulla superficie degli epatociti e la stessa via di accesso.

Il virus Delta è una particella sferica di circa 36 nm di diametro avvolto in un "mantello" costituito dall'antigene di superficie dell'HBV (HBsAg) e contiene all'interno una ribonucleoproteina HDV.

Il virus Delta è un virus RNA che utilizza le proteine del "mantello" dell'HBV per l'assemblaggio delle sue particelle infettive e ne richiede pertanto la presenza. L'infezione da virus D si realizza solo in soggetti HBsAg positivi.

La diagnosi dell'epatite D si basa sul rilevamento del genoma HDV RNA nel sangue e nel fegato mentre gli anticorpi specifici di classe IgG indicano una infezione pregressa mentre quelli di classe IgM una infezione acuta.

La coinfezione da HDV-HBV è considerata la forma più grave di epatite virale cronica a causa della più rapida progressione verso un danno epatico grave, con la comparsa di cirrosi ed epatocarcinoma ⁽¹⁵⁾ ⁽¹⁶⁾.

Il virus HBV è tra i principali virus contaminanti i prodotti del sangue che per essere messi in uso devono essere sottoposti a procedure autorizzative e di validazione. La procedura di validazione non è agevole con il virus HBV umano a causa della mancanza di affidabili metodi di coltura cellulare in vitro per l'assenza di linee cellulari in grado di supportare l'infezione.

Per tali motivi viene a mancare sia la possibilità tecnica di allestire adeguate prove di riproducibilità e di verifica della efficacia dei metodi di inattivazione/rimozione che la possibilità di ottenere risultati conformi agli standard predefiniti poiché i modelli di coltura cellulare costituiscono il cardine delle procedure di controllo ⁽¹⁷⁾.

Il Ministero della Salute, consapevole della suddetta problematica, già con circolare n. 68 del 24.7.1978 dal titolo "Ricerca dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg) nel sangue umano e derivati" ha dato indicazioni per quanto riguarda la ricerca dell'antigene precisando che gli emoderivati a lunga conservazione ed i derivati ottenuti per frazionamento del plasma devono essere preparati esclusivamente da ogni singola unità di plasma risultata negativa alla ricerca dell'HBsAg imponendo la ricerca radioimmunologica dell'HBsAg con metodo di III generazione anche sul prodotto finito, lotto per lotto. Successivamente, con telegramma prot n.800.7/340 bis del 12 dicembre 1992 alle aziende produttrici il Ministero della Salute ha precisato che la disposizione del 1-12-1992 deve "riferirsi non ai prodotti, bensì ad ogni singola donazione di plasma".

Gli studi di infettività dell'HBV sono limitati anche dalla scarsità di modelli animali suscettibili che generalmente richiedono alte dosi di virus per l'infezione. In particolare il virus HBV umano è rappresentato dal virus dell'epatite dello scoiattolo (ground squirrel hepatitis virus GSHV), dal virus dell'epatite della marmotta (woodchuck hepatitis virus: WHV) e dal virus dell'epatite B dell'anatra (duck hepatitis B virus: DHBV).

Inoltre la scoperta che lo scimpanzé può essere infettato e avere una evoluzione della malattia simile quella dell'uomo ha permesso di conseguire importanti progressi nella conoscenza della malattia.

Le ricerche sull'HBV benché difficoltose per la mancanza di linee cellulari idonee hanno consentito notevoli progressi nella comprensione della struttura del virus, della sua insolita strategia replicativa secondo cui replica come un retrovirus attraverso la trascrittasi inversa di un intermedio a RNA, chiamato RNA pregenomico e della patogenesi della malattia.

Un alternativo approccio potrebbe essere quello di isolare e amplificare il genoma virale presente in donazioni di sangue positive per HBsAg/ HBV DNA negative per esperimenti di trasfezione in vitro e studiare il virus replicativo come surrogato dell'infettività ⁽¹⁸⁾.

A causa della indisponibilità di un sistema culturale permissivo per HBV e per il virus dell'epatite non-A non-B, la capacità di inattivazione della fase di pastorizzazione è stata valutata negli scimpanzé o negli anatroccoli. Nonostante questi prodotti terapeutici abbiano fornito salvavita e opzioni terapeutiche per i pazienti, sono stati osservati casi di virus trasmessi a intermittenza, in particolare HBV, virus dell'epatite C (HCV) e immunodeficienza umana virus (HIV).

Gli emoderivati possono provenire da donatori negativi ai tests di screening ma comunque infetti per i seguenti principali motivi:

1. periodo finestra dei donatori
2. infezione HBV occulta
3. insufficiente sensibilità dei tests diagnostici
4. inefficienza del trattamento di sterilizzazione

Nel primo caso relativo al periodo finestra si osserva che un individuo HBsAg negativo veniva ritenuto idoneo a donare il sangue mentre un individuo positivo era ritenuto non idoneo alla donazione.

Il maggior rischio residuo di trasmissione per HBV rispetto a quello delle altre due infezioni HCV ed HIV è attribuito all'intervallo di tempo tra l'infezione iniziale ed al primo rilevamento positivo in cui il virus è trasmissibile in quanto l'unità di sangue è stata prelevata ad un donatore nel periodo di siero conversione.

Durante questo periodo di tempo il sangue contiene il virus pienamente infettante e non rilevabile.

La quantificazione del rischio trasfusionale residuo per malattie virali trasmissibili viene effettuata utilizzando modelli matematici basati sul tasso di incidenza della infezione e sulla lunghezza del periodo finestra.

Il secondo caso è relativo alla infezione da HBV “*occulta*”. Negli anni recenti, dalle osservazioni del ciclo di replicazione del virus HBV appariva sempre più evidente un particolare tipo di infezione che non rispondeva ai canoni conosciuti e presentava caratteristiche decisamente uniche tali da indurre l’osservazione scientifica ad individuare un nuovo tipo di epatite B definita “*occulta*” (OBI) dal momento che non era più realistico ritenere che l’infezione da HBV potesse essere diagnosticata solo quando nel sangue fosse rilevabile l’HBsAg.

L’infezione definita “*occulta*” è caratterizzata dalla persistente negatività per l’HBsAg sierico e dalla presenza nei nuclei degli epatociti del genoma virale dell’HBV nella forma molecolare intermedia del ciclo replicativo chiamata *covalently closed circular* (cccDNA HBV) costituito da una doppia elica completa come un vero e proprio minicromosoma che funge da stampo per la trascrizione di tutti gli RNA virali. In genere, anche se in modo altalenante, l’HBV DNA è presente nel siero ad un basso livello, inferiore a 200 IU/ml, in confronto con i livelli di 10³ – 10⁸ IU/ml che si rilevano generalmente nei soggetti HBsAg positivi.

La causa della soppressione della replicazione virale e dell’espressione genica avviene per meccanismi ancora non ben individuati per cui la infezione occulta è ritenuta multifattoriale.

Dal punto di vista epidemiologico la epatite B occulta è presente in tutte le aree geografiche e la sua distribuzione riflette la generale prevalenza dell’infezione da HBV.

Le conoscenze scientifiche sull’epatite occulta si sono rivelate particolarmente utili sia sotto l’aspetto della medicina trasfusionale che quella clinica. In particolare nello studio della epatite B post-trasfusionale era concepibile una reale possibilità che qualcuna delle unità di plasma utilizzate potesse essere infetta da HBV.

Fino al 2008 il fattore principale di rischio era considerato costituito dal “*periodo finestra*” cioè il tempo intercorrente tra l’infezione e la prima positività del saggio di riconoscimento dell’HBsAg attualmente ridotto a 35 giorni con l’introduzione della tecnica NAT (Nucleic Acid Testing), eseguita sulle singole donazioni che ha ridotto, ma non completamente escluso, il rischio di epatite B post-Trasfusionale.

Il criterio di valutazione dell’epatite occulta è stato definito nel 2008 in un apposito convegno scientifico internazionale dal titolo “*Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection*”.

Tra le conclusioni del convegno è stato rilevato che, insieme con il periodo finestra, l’epatite B occulta, presente in tutte le aree geografiche la cui distribuzione riflette la generale prevalenza dell’infezione da HBV, rappresenta, insieme con il periodo finestra, la principale causa di epatite B post-trasfusionale.

La causa della soppressione della replicazione virale e dell’espressione genica avviene per meccanismi ancora non ben individuati per cui la infezione *occulta* è ritenuta multifattoriale.

Fra i diversi possibili meccanismi patogenetici più significativi la situazione di positività per HBV DNA e negatività per HBsAg può dipendere da una disregolazione del comportamento del sistema immune responsabile della inibizione dell’espressione genica dell’HBV al livello post-trascrizionale inducendo delle mutazioni, in particolare del gene virale S, che inibiscono l’espressione dell’HBsAg e cambiamenti della antigenicità rendendo impossibile il riconoscimento dell’HBsAg con i saggi commerciali in uso.

In particolare nello studio della epatite B post-trasfusionale era evidente una reale possibilità che qualcuna delle unità di plasma utilizzate potesse essere infetta da HBV. Fino al 2008 il fattore principale di rischio era considerato costituito dal “*periodo finestra*”.

Un individuo negativo per l’HBsAg veniva ritenuto idoneo a donare il sangue mentre un individuo positivo era ritenuto non idoneo alla donazione.

Il rischio residuo di trasmissione per HBV era attribuito al lungo intervallo di tempo tra l'infezione iniziale HBV ed il primo rilevamento dell'HBsAg durante il quale il virus è trasmissibile, pienamente infettante e non rilevabile con il test dell'HBsAg.

La letteratura scientifica evidenzia che in generale tutte le categorie di pazienti a rischio di infezione a trasmissione parenterale (tossicodipendenti, emodializzati, politrasfusi) sono considerati a rischio di epatite B occulta a causa della dipendenza dallo stato del sistema immunitario.

La inibizione della replicazione dell'HBV può essere temporanea e reversibile e l'infezione occulta può essere riattivata esitando in una epatite acuta o in una severa forma di epatite B. I soggetti immunocompetenti adulti se infettati da HBV nel 90-95% risolvono l'infezione formando l'anticorpo anti-HBs con guarigione clinica.

I motivi principali per cui il 5-10% rimangono cronici sono riconducibili a comportamenti anomali del sistema immunitario ^{(19) (20) (21) (22)}.

Il terzo caso comprende una situazione in cui nel corso della infezione da HBV il rilevamento dell'HBsAg risulta negativo a causa di formazione di ceppi virali immunovarianti che determinano l'HBsAg non rilevabile dagli anticorpi utilizzati nel test di screening. Non va dimenticato il problema dei portatori cronici con un quadro sierologico non definito dovuto alla presenza di mutanti virali HBsAg ⁽²³⁾.

Il virus HBV è caratterizzato da una notevole eterogeneità genetica determinata dall'impiego nel ciclo di replicazione dell'enzima trascrittasi inversa virale che presenta scarsa fedeltà di trascrizione e assenza di attività di "correttore di bozze" provocando la sintesi di una percentuale piuttosto elevata di incorporazione nucleotidica erranea.

Il virus HBV è classificato in 4 sierotipi (adw, adr, ayw, ayr) che condividono il determinante "a".

La comparsa di mutazioni dell'epitopo "a" dell'antigene di superficie che alterano la sequenza amminoacidica dell'HBsAg, avendo un elevato tasso di mutazione (104-105 per base per ciclo), rende i virus mutati non più riconoscibili dagli anticorpi specifici.

Questa situazione è dovuta ad una particolare peculiarità della biologia del virus in quanto il danno epatico viene sostanzialmente causato dalla risposta immune dell'ospite essendo l'HBV sprovvisto di effetto citopatico diretto.

Alcune varianti dell'epitopo "a" reagiscono solamente con anticorpi policlonali, per cui l'utilizzo nei kit di screening di anticorpi monoclonali espone al rischio di non rilevare la presenza di questi virus mutanti.

Tuttavia la maggior parte delle mutazioni che avvengono durante la replicazione non sono mantenute nella popolazione virale che è piuttosto omogenea anche se possono emergere degli "escape mutants" selezionati dalla risposta immune ^{(24) (25)}.

La soppressione di HBV può essere dovuta alla persistenza della vigorosa memoria T cellulare contro gli antigeni dell'HBV presente per molti anni dopo la guarigione della epatite acuta B oppure alla coinfezione con altri virus o alla presenza di proteine cellulari che regolano l'espressione dei geni ⁽²⁶⁾.

Il virus HBV persiste nel tessuto epatico per decenni dopo la guarigione e la sua presenza di per sé non ha rilevanti conseguenze cliniche finché persiste la sorveglianza immunitaria. Qualora il paziente vada incontro a immunodepressione il virus occulto si riattiva e può manifestarsi clinicamente.

Nonostante lo screening delle unità di sangue per HBsAg abbia notevolmente ridotto l'incidenza di epatite B post-trasfusionale esiste l'evidenza che la trasmissione può avvenire da donatori completamente negativi ai marcatori sierici di HBV con infezione occulta ⁽²⁷⁾.

Il quarto caso si riferisce alla inefficienza del trattamento di inattivazione/rimozione virale.

In medicina trasfusionale è recentemente entrata nell'uso una procedura chiamata *leucodeplezione*, un processo mirante a ridurre il livello dei leucociti da 10⁹ ad un livello inferiore a 5.10⁶ unità di sangue mantenendo conservato l'85% del sangue intero o dei globuli rossi con l'uso di metodiche rigorose e ben standardizzate.

Nel 1999, nel Regno Unito, è stata adottata a fini precauzionali la leucodeplezione obbligatoria del sangue intero donato.

È stato stimato che la leucodeplezione sia in grado di rimuovere circa il 50% dell'infettività associata ai globuli bianchi.

Dal luglio 1999, Portogallo, Irlanda, Lussemburgo e Canada hanno adottato la leucodeplezione del sangue e dei suoi componenti.

In Francia, la leucodeplezione è stata adottata a partire dal 1998 solo per gli eritrociti concentrati, divenendo obbligatoria nell'Aprile del 2001 per gli altri componenti labili e il plasma da frazionamento. Nel 1999 la leucodeplezione *prestorage* è stata adottata nel Regno Unito, in Portogallo, in Irlanda, in Lussemburgo e Canada Austria e Norvegia e nell'aprile 2001 in Francia.

In altri Paesi come Svizzera, Belgio, Olanda, Germania e Scozia, la decisione di preparare emocomponenti con leucodeplezione totale è lasciata all'iniziativa di alcuni e su richiesta.

I dati clinici evidenziano l'assenza di reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche, oltre alla alloimmunizzazione nei pazienti politrasfusi o che richiedono ripetuto uso di emoderivati.

La trasfusione dei leucociti allogenicici del donatore che sono presenti negli emocomponenti cellulari determina una serie di reazioni sfavorevoli, provate e percepite, nei riceventi. Anche una modesta riduzione del numero di leucociti è in grado di ridurre le reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche.

Questa complicazione della trasfusione di concentrato eritrocitario e la prevenzione di reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche è fra le indicazioni primarie della leucodeplezione.

Il trattamento *prestorage*, la riduzione dei globuli bianchi effettuata precocemente subito dopo il prelievo di sangue dal donatore, permette di diminuire le lesioni dei globuli rossi rese possibili durante il periodo di conservazione, di rimuovere i globuli bianchi prima della loro frammentazione e di evitare l'accumulo di citochine di origine leucocitaria negli emocomponenti implicate nella patogenesi delle reazioni trasfusionali febbrili sia emolitiche che non emolitiche.

Poiché i leucociti sono la principale fonte di citochine, la diminuzione delle reazioni febbrili è funzione della loro rimozione.

Nel 1998 nel Regno Unito e nel Canada è stata adottata la procedura *prestorage* seguiti da Portogallo, Irlanda, Lussemburgo, Austria.

In Francia è stata inizialmente usata dal 1998 per gli eritrociti concentrati e poi resa obbligatoria nel 2001.

La leucodeplezione con le disposizioni relative ai requisiti di qualità e sicurezza del sangue e degli emocomponenti è stata introdotta in Italia con decreto n. 69 del Ministero della Salute il 2 novembre 2015 ed obbliga, entro dodici mesi dall'entrata in vigore del decreto, che tutti gli emocomponenti eritrocitari e piastrinici siano prodotti con leucodeplezione mediante filtrazione *prestorage*, tale da garantire l'ottenimento, prima della conservazione, di un residuo leucocitario per unità inferiore a 1×10^6 , al fine di ridurre gli eventi avversi associati alla contaminazione leucocitaria degli emocomponenti eritrocitari e piastrinici.

La leucodeplezione del sangue e degli emoderivati è da ritenersi fondamentale per la sicurezza ed ha acquisito nella medicina trasfusionale notevole importanza dal momento che i prodotti terapeutici preparati dal plasma umano vengono utilizzati per centinaia di migliaia di pazienti ogni anno.

L'efficiente preparazione di questi prodotti richiede l'istituzione di grandi pool di partenza di plasma umano, ciascuno costituito fino a 10.000 donazioni. Questo consente di disporre di preparati con elevati titoli anticorpali ed ampio spettro di azione.

Tuttavia quanto più è elevato il numero dei donatori tanto più è elevata la probabilità che una donazione possa essere HBV infetta.

Infatti, mischiare il plasma non completamente sicuro in pool sempre più grandi è stata nel passato una delle cause principali della diffusione dei contagi (28) (29) (30) (31).

Emazie leucodeplete

Si ottengono mediante filtrazione del concentrato eritrocitario, che può essere effettuato in laboratorio o, al letto del paziente, in corso di trasfusione. In teoria presentano numerosi vantaggi rispetto ai preparati precedenti:

- riduzione alloimmunizzazione
- riduzione infezioni post-operatorie

- riduzione reazioni trasfusionali non-emolitiche
- riduzione Graft Versus Host Disease (GVHD)
- riduzione trasmissione patogeni (CMV, CJD)
- riduzione mortalità post-operatoria (cardio-chirurgia)
- riduzione ospedalizzazione

In alcuni paesi (Gran Bretagna, Olanda) la leucodeplezione viene effettuata su tutti i concentrati eritrocitari (leucodeplezione universale); in altri (Italia, USA, Canada) viene impiegata solo in casi selezionati, ritenendo che non vi sia la dimostrazione di un vantaggio tale, rispetto alla rimozione del buffy-coat, da giustificare l'aumento dei costi.

Il preparato viene conservato nelle stesse condizioni (2-6°C) e per lo stesso tempo del componente eritrocitario da cui deriva ⁽³²⁾.

Acqua iniettabile

Per permettere un metodo di produzione di acqua per iniettabili diverso dalla distillazione nell'aprile 2017, la Farmacopea Europea ha autorizzato un processo di purificazione chiamato osmosi inversa, che può essere a passaggio singolo o doppio, abbinata ad altre tecniche, come l'elettrodeionizzazione, l'ultrafiltrazione o la nanofiltrazione.

Questo cambiamento introdotto dalla Farmacopea Europea per la taratura e validazione dei sistemi per acque farmaceutiche ha avviato un'inversione di tendenza nell'industria introducendo impianti produttivi di acqua fredda per preparazioni iniettabili che integrano strumenti a osmosi inversa, elettrodeionizzazione e ultrafiltrazione.

Secondo l'EMA, il problema principale con i metodi di produzione senza distillazione ruota attorno alla qualità microbiologica dell'acqua e ai controlli e monitoraggi necessari a garantire l'individuazione e l'eliminazione dei microbi.

L'EMA nel suo documento afferma che: "Dovrebbero essere adottati metodi di test microbiologici alternativi/rapidi come parte della strategia di controllo generale per il sistema".

L'introduzione della tecnologia di amplificazione degli acidi nucleici (NAT) per il test del DNA dell'HBV con la sua elevata sensibilità e specificità

ha contribuito a risolvere le problematiche sopra descritte e permesso inoltre una sostanziale riduzione del periodo finestra di circa 25-30 giorni durante il quale le donazioni infettive non vengono rilevate.

Sulla base di questo assunto fu possibile attribuire, attraverso studi collaborativi internazionali, il contenuto in Unità Internazionali (UI) alle varie preparazioni di riferimento sviluppate dall'ente inglese National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Tuttavia va sottolineato che una preparazione di riferimento il cui contenuto virale sia espresso in UI non rientra nella rigorosa definizione di "primary international biological reference material" dettata dalla International Organisation for Standardisation (ISO).

I materiali di riferimento dovrebbero avere una concentrazione espressa in unità di misura, come ad esempio milligrammi o moli, che il Sistema Internazionale di Misura ha adottato per quelle sostanze le cui procedure analitiche sono universalmente definite.

Questi criteri ovviamente non possono essere applicati a quegli analiti poco definiti dal punto di vista chimico-fisico ed eterogenei, per i quali i test oggi disponibili si basano essenzialmente sulla determinazione di funzioni biologiche, su procedure per il rilevamento del complesso antigene-anticorpo o su tecniche NAT ⁽³³⁾.

HCV: VIRUS DELL'EPATITE C

Il virus (HCV) è l'agente eziologico dell'epatite virale C è un membro della famiglia dei Flaviviridae del genere *Hepacivirus*.

È un virus dal diametro di 55-65 nm dotato di un pericapside a composizione prevalentemente lipidica e di un capsido icosaedrico contenente una molecola di RNA a filamento singolo con polarità positiva, lungo all'incirca 9.600 nucleotidi.

Il genoma alle estremità 5' e 3' contiene due regioni non codificanti e codifica per una singola poliproteina di 3000 amminoacidi. L'HCV replica nel citoplasma tramite l'enzima RNA polimerasi RNA dipendente (proteina NS5B) codificata dalla regione NS5 che trascrive lo stampo RNA negativo sul quale si copia l'RNA genomico. L'HCV RNA antisenso, intermedio di replicazione, è indice di replicazione virale e di

infezione produttiva.

Le glicoproteine E1b e E2 formano il “mantello” di rivestimento del virus e la proteina del core concorre alla formazione del nucleo capsidico.

Il danno del virus HCV è principalmente immunomediato e oltre a infettare gli epatociti, sito di elezione, può invadere il sistema nervoso centrale e replicare anche nei leucociti, compresi i monociti/macrofagi.

I monociti infetti possono attraversare la barriera ematoencefalica e quindi fornire l'accesso all'HCV nel sistema nervoso centrale in un processo simile a quello per HIV. Alcuni sintomi, quali la depressione ed i disturbi cognitivi, risultano essere associati all'infezione cronica da HCV che non essendo esclusivamente epatotropico, sia nel caso di infezione conclamata che occulta, può replicarsi nelle cellule della linea macrofagica inclusi i monociti ed i macrofagi capaci di superare la barriera ematoencefalica e quindi veicolare il virus nelle cellule cerebrali consentendogli di stabilirsi e compromettendone le funzioni.

In tale situazione di stress cronico viene incrementato il rilascio di citochine pro infiammatorie, IL1, IL6 e TNF α , che determinano contestualmente disturbi emozionali (34) (35) (36).

La letteratura scientifica conferma che l'HCV non è solo causa di epatite ma che è implicato in altre situazioni patologiche.

L'infezione da HCV può provocare insulino-resistenza epatica ed extraepatica collegata ad alterazioni dell'omeostasi glicidica, indipendente dal genotipo virale, causando significative alterazioni del metabolismo glicidico mentre la steatosi epatica è causata da alterazione del metabolismo lipidico.

La prevalenza mondiale dell'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è del 3% con una stima di 71 milioni di persone che sono infettate in modo persistente.

Non è stato ancora prodotto un vaccino contro l'HCV per cui sono consigliabili misure profilattiche rappresentate dalle generali norme igieniche di comportamento.

La gravità dell'infezione da HCV varia da sintomi lievi a gravi. L'infezione cronica può portare a cirrosi epatica e infine carcinoma epatocellulare (HCC). I nuovi farmaci antivirali ad azione diretta (DAA, Direct Acting Antivirals) che agiscono in varie fasi della replicazione del virus quali gli inibitori della proteasi e della polimerasi sono ben tollerati e molto efficaci ed hanno rappresentato notevoli progressi e completamente sostituito il trattamento con Interferone poco efficace e gravato da importanti effetti collaterali.

Questi farmaci hanno permesso di semplificare drasticamente le terapie, portare i tassi di cura quasi al 100%, permettendo di trattare tutti i pazienti, indipendentemente dal genotipo, da patologie associate, cirrosi, con effetti collaterali poco significativi.

Tuttavia permangono importanti preoccupazioni sulla resistenza a tali farmaci, sui costi elevati e incertezze sugli effetti a lungo termine dell'infezione cronica.

A causa dello stretto tropismo dell'HCV, gli studi in vivo sono stati a lungo limitati agli scimpanzé.

Nel corso degli anni, altre specie animali sono state valutate per la loro suscettibilità all'infezione da HCV. Di tutti i modelli animali utilizzati nella ricerca, i roditori sono attualmente le specie più studiate.

La manipolazione genetica dell'ospite può essere applicata per abbattere alcuni fattori dell'ospite che interferiscono con la replicazione virale o, d'altra parte, per integrare l'ospite con fattori umani che sono essenziali per questo processo.

La propagazione dell'HCV nelle cellule di roditori è inefficiente, presumibilmente a causa dell'incompatibilità genetica dei cofattori dei roditori e/o della soppressione della replicazione dell'HCV da parte delle difese immunitarie innate dei roditori.

Pertanto, i topi ingegneristici che esprimono i geni umani rilevanti e/o con fattori di restrizione del topo eliminati possono consentire la propagazione dell'HCV.

Tra i modelli di animali non roditori lo scimpanzé (*Pan troglodytes*) ha svolto un ruolo importante nella scoperta dell'HCV.

Il genoma virale dell'HCV è stato clonato da uno scimpanzé infettato sperimentalmente con epatite non-A, non-B⁽³⁷⁾.

Nonostante una elevata omologia genomica tra umani e scimpanzé, sono state evidenziate alcune significative differenze nella malattia.

Pochi scimpanzé cronicizzano mentre solo una minoranza di esseri umani elimina spontaneamente un'infezione acuta (15%) evolvendo in maggioranza in patologia cronica⁽³⁸⁾.

Tuttavia, lo scimpanzé si è dimostrato molto prezioso per lo studio degli aspetti molecolari, immunologici e clinici. Inoltre, mentre è praticamente impossibile studiare la fase acuta dell'infezione da HCV nell'uomo, l'infezione sperimentale di scimpanzé consente un attento monitoraggio della cinetica virale, della risposta immunitaria dell'ospite, della manifestazione della malattia e dei risultati in modo altamente controllato.

Il modello di scimpanzé soddisfa molti dei requisiti di un buon modello animale.

Tuttavia, la disponibilità limitata e i vincoli etici e finanziari associati a questi studi sono gli svantaggi principali che hanno indotto ad interrompere il loro utilizzo. Il toporagno dell'albero (*Tupaia belangeri*) è un mammifero non roditore simile allo scoiattolo che è permissivo per la viremia persistente di basso livello di HCV, compresi i disturbi epatici correlati all'HCV.

Di recente, Ding et al. hanno sviluppato un modello di pesce zebra (*zebrafish*) per la replicazione dell'HCV sub-genomica.

Il pesce zebra è uno dei vertebrati maggiormente utilizzati come modello per le sue piccole dimensioni, facile da gestire sperimentalmente e utile per studiare i meccanismi di replicazione dell'HCV e patologia epatica in vivo oltre che nella valutazione di nuovi farmaci anti-HCV⁽³⁹⁾.

I topi che esprimono transgenicamente le proteine virali sono stati creati per studiare le interazioni in vivo tra le proteine virali e la cellula ospite.

Poiché i topi non sono naturalmente suscettibili all'infezione da HCV, l'approccio per superare la barriera delle specie è stato quello di umanizzare

il fegato attraverso il trapianto di epatociti umani primari. In questo modo, i topi possono non solo essere infettati con HCV, ma anche con altri patogeni epatotropi umani.

Il topo Trimerica è stato il primo modello chimerico composto da tre fonti di tessuto geneticamente diverse, cioè topo ricevente, topo donatore di midollo osseo e tessuto epatico umano, da cui il suo nome.

Nel loro insieme, il modello di topo con fegato umano chimerico si è dimostrato utile per gli studi sul metabolismo in vivo, la ricerca di biologia di base sull'infezione da HCV e la valutazione di diverse terapie antivirali e strategie di immunizzazione passiva. I modelli alternativi si basano sull'uso di omologhi HCV.

Questi virus correlati all'HCV infettano roditori, cavalli o cani e possono quindi essere utilizzati per studiare la biologia virale, la patogenesi e le risposte immunitarie dell'ospite in un ambiente immunocompetente.

La letteratura scientifica ha recentemente evidenziato l'esistenza di una forma di epatite da HCV definita "occulta" che è stata dapprima descritta in pazienti anti-HCV e HCV RNA sierici negativi con valori anormali degli enzimi epatici ma che presentavano HCV RNA negli epatociti.

Dal punto di vista immunologico è probabilmente valida l'ipotesi che l'epatite C occulta sia il risultato della incapacità del sistema immunitario a riconoscere in modo corretto gli antigeni dell'HCV e produrre quindi gli anticorpi specifici.

Un altro meccanismo potrebbe essere dovuto alla infezione con ceppi virali atipici.

Le ragioni per cui i portatori di infezione occulta non presentano HCV RNA genomico nel siero possono dipendere da una disregolazione del comportamento del sistema immune responsabile della inibizione dell'espressione genica.

È stato evidenziato che pazienti con epatite HCV occulta hanno una risposta delle cellule CD4+ T significativamente più frequente rispetto ai pazienti con epatite cronica HCV e con epatite criptogenetica oltre ad avere un numero più elevato di cellule T CD8+.

E' quindi da presumere, fra le più importanti cause della infezione HCV occulta, l'esistenza di un difetto funzionale dei linfociti T citotossici che può dipendere da più fattori quali una elevata e persistente viremia capace di determinare un loro esaurimento funzionale, da un difetto funzionale dei linfociti T helper il cui compito è coadiuvare i linfociti T citotossici, oltre che dall'infezione degli stessi linfociti T citotossici da parte del virus costituendo in tal caso riserva per la replicazione virale.

La risposta cellulare immunospecifica è dimostrata essere più frequente nella epatite occulta HCV che nella epatite cronica HCV positiva e la sua minore severità, presumibilmente dovuta ad un basso numero di epatociti infetti, potrebbe essere conseguenza del comportamento del sistema immunitario.

L'esistenza della epatite HCV occulta è stata documentata in tutto il mondo ed è stata diagnosticata in numerosi gruppi di soggetti ad alto rischio quali gli emodializzati e pazienti con epatite criptogenetica costituita da una malattia cronica epatica di sconosciuta eziologia. In una percentuale significativa di soggetti affetti da malattia cronica epatica di sconosciuta eziologia numerosi studi hanno associato l'epatite HCV occulta ad attività necroinfiammatoria e fibrosi potenzialmente causa di evoluzione in cirrosi e carcinoma epatocellulare.

L'epatite HCV occulta è implicata nello sviluppo della malattia renale.

Alcuni autori hanno documentato l'identificazione della malattia renale in paziente con membranoglomerulonefrite e risposta virologica sostenuta in assenza di HCV RNA nel siero e nel fegato.

Altri studi hanno evidenziato la presenza dell'HCV RNA antisense nelle cellule mononucleate di sangue aprendo una grande problematica nella gestione della emodialisi cronica.

In pazienti emodializzati anti-HCV e HCV RNA sieronegativi con la malattia renale cronica ed alterati livelli degli enzimi epatici è stata evidenziata nelle cellule mononucleate di sangue periferico la presenza dell'HCV RNA genomico antisense, intermedio di

replicazione virale.

Tale situazione riveste particolare importanza ai fini della gestione dei soggetti in emodialisi ^{(40) (41)}.

L'associazione con cirrosi epatica ha evidenziato un ruolo favorevole nello sviluppo del carcinoma epatocellulare.

I risultati delle indagini eseguite hanno mostrato che anche l'infezione occulta HCV può contribuire allo sviluppo del carcinoma epatocellulare.

HIV-1 HIV-2: VIRUS DELL'AIDS

L'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) è causata da due retrovirus simili, HIV-1 e HIV-2.

L'HIV-1 è stato il primo ad essere scoperto, è più virulento e prevalentemente localizzato in Europa, America e Africa centrale mentre il secondo, HIV-2 si trova per lo più in Africa occidentale e Asia e determina una sindrome clinicamente più moderata.

Il virus è collocato nella sottofamiglia Lentivirinae sulla base di parametri genetici e morfologici.

Il virus HIV dapprima produce un DNA intermedio per mezzo della trascrittasi inversa cui segue l'integrazione nel DNA dell'ospite (host DNA) e quindi utilizza la RNA polimerasi dell'ospite (host RNA polymerase) per generare il virione RNA.

Il genoma è costituito da due copie di RNA identiche a polarità positiva, è lungo 9,7 kb ed ha la stessa organizzazione generale degli altri retrovirus costituita da tre geni strutturali *gag*, *pol*, *env*.

L'HIV è un virus diploide i cui due singoli filamenti sono legati a due proteine basiche di 7 e 9 kDa, denominate p7 e p9 presenti nel core insieme con l'enzima DNA polimerasi RNA dipendente.

Il primo evento che condiziona l'infezione della cellula bersaglio da parte del virus è il legame della glicoproteina virale di superficie gp120 con la molecola CD4, antigene di superficie espresso dai linfociti T-helper e i monociti/macrofagi.

Inoltre può infettare le cellule della microglia nel sistema nervoso centrale che non esprimono la molecola di superficie CD4.

Il virus HIV è in grado di generare sincizi per la fusione delle membrane di cellule infette tra loro oppure dopo fusione con cellule sane a causa del legame che si può formare tra gp120 (una proteina espressa dal virus) e CD4 (struttura di membrana dei linfociti T helper).

A seguito della fusione si determina un marcato rigonfiamento e ne consegue morte cellulare in poche ore.

Gli eventi che seguono il rilascio dell'RNA genomico virale nel citoplasma sono rappresentati dalla trascrizione dell'RNA virale in DNA a doppia elica ad opera della trascrittasi inversa e dalla integrazione del DNA provirale nei cromosomi dell'ospite mediata da enzimi virali.

Gli RNA messaggeri vengono tradotti in proteine strutturali che insieme all'RNA genomico si assemblano in nuovi virioni che mediante gemmazione escono dalla cellula andando ad infettare nuove cellule,

Il virus HIV per la sua espressione da provirus integrato utilizza gli apparati trascrizionali e trasduzionali della cellula e può generare una molecola di RNA messaggero che viene tradotta nelle proteine strutturali di cui il virus ha bisogno per la replicazione ⁽⁴²⁾.

VIRUS DELL'EPATITE A

Il virus dell'epatite A (HAV) è un virus RNA membro della famiglia degli Enterovirus gruppo dei Picornaviridae a RNA privo di "mantello" classificato come prototipo del nuovo genere degli *Hepatovirus* e rilevabile nel citoplasma degli epatociti.

Il genoma dell'RNA a singolo filamento contiene un solo quadro di lettura aperto che consente di codificare un'intera proteina senza incontrare codoni di stop e quindi formare una proteina tronca.

La poliproteina codificata comprende proteine strutturali per il capsido di diametro compreso tra 27 e 28 nm oltre a proteine non strutturali con attività di proteasi e polimerasi e altre proteine con funzioni che non sono state ancora completamente determinate. Il virus è costituito da un capsido contenente un singolo filamento di RNA a polarità positiva lungo

7.47 nucleotidi costituito da un capsido icosaedrico dal diametro di 27 nm formato da quattro polipeptidi (VP1, VP2, VP3, VP4 e VP5).

HAV possiede un solo sierotipo.

La replicazione dell'RNA del virus coinvolge l'enzima virale RNA-polimerasi RNA-dipendente che a partire dall'RNA a polarità positiva trascrive un mRNA a polarità negativa dal quale viene sintetizzato l'RNA a polarità positiva del virus. HAV, a differenza di altri picornavirus non è citolitico ma viene rilasciato dagli epatociti per esocitosi.

L'HAV si replica nel fegato, viene escreto nella bile e si trova in alte concentrazioni nelle feci ove può essere rilevato fino a 10 settimane dopo l'inizio dei sintomi.

Sette genotipi HAV sono stati identificati con una distribuzione geografica unica, quattro genotipi si trovano nell'uomo (I, II, III, IV).

Il genotipo IA è il più comune seguito dal genotipo IB e IIIA (0.7%). Il virus HAV si trasmette quasi esclusivamente per via oro-fecale, in relazione a viaggi nelle zone ad elevata e media endemia e generalmente mediante l'ingestione di acqua o cibo contaminato, spesso molluschi bivalvi come ostriche, vongole o cozze che filtrano acqua con residui fecali contenenti il virus, mentre è insolita la trasmissione parenterale così come quella sessuale.

Dal 1979 è stato possibile coltivare in vitro HAV consentendo la preparazione in Italia di due vaccini efficaci ed affidabili.

L'epatite da HAV è una malattia lieve che interessa generalmente i bambini con decorso generalmente autolimitante e benigno anche se non è rara tra gli adulti in cui può avere un decorso grave, talvolta protratto, ma comunque senza causare una infezione cronica né tendenze alla cronicizzazione non esistendo lo stato di portatore cronico dell'HAV, né nel sangue, né nelle feci.

Dopo la guarigione l'anti-HAV di tipo IgG persiste a lungo, probabilmente per tutta la vita.

La patogenesi dell'infezione da HAV non è completamente compresa.

Tuttavia, l'assenza di cambiamenti citopatici nella coltura cellulare e la dimostrazione di cellule killer naturali dirette dall'HAV e cellule killer attivate dalle linfocine in vitro suggeriscono che l'immunità cellulo-mediata è responsabile del danno epatocellulare. Un soggetto affetto da epatite A è infettante per un limitato periodo di tempo limitato, 15-30 giorni, ed i pazienti guariscono senza cronicizzare.

L'epatite A è perpetuata attraverso la trasmissione del virus da soggetto infetto a soggetto suscettibile attraverso contatto diretto interpersonale con acqua o cibo contaminati o mitili.

E' stato rilevato che il virus HAV può essere trasmesso anche nei medicinali derivati dal plasma per cui sono stati studiati passaggi efficaci per l'inattivazione dell'HAV come il processo di pastorizzazione per 10 ore a 60°C in fase liquida idoneo ad inattivare il virus. La fase di inattivazione del calore utilizzata nella produzione di fattori della coagulazione potrebbe essere efficace contro il virus dell'epatite A ma inefficace contro un altro virus senza "mantello".

L'efficacia della inattivazione verso analoghi virus senza "mantello" dipende da specifiche condizioni operative come la scelta di idonei agenti stabilizzanti ⁽⁴³⁾.

B 19 PARVOVIRUS

Il B 19 parvovirus (Erythrovirus B19) è un virus unico membro della famiglia *Parvoviridae* del genere degli Eritrovirus del diametro di 20 nm, costituito da un DNA a singola elica di forma sferica a simmetria icosaedrica privo di "mantello" isolato per la prima volta nel 1975.

La sua resistenza al calore lo rende stabile a 60°C per almeno 16 ore. E' il più piccolo DNA-virus patogeno per l'uomo.

Il virus è dotato di un capsido icosaedrico costituito da 2 proteine strutturali che racchiudono il DNA dotate di attività immunogena.

Il capsido non è dotato di "mantello".

Il contagio avviene preferibilmente attraverso le secrezioni respiratorie, l'espettorato o il muco nasale quando una persona infetta tossisce o starnutisce.

Il parvovirus B 19 può anche essere trasmesso per via ematica, con trasfusioni di sangue ed emoderivati. Una donna incinta infettata dal parvovirus B19 può trasmettere il virus al suo bambino.

Il parvovirus B 19 causa più comunemente la "quinta malattia", un esantema tipicamente infantile che colpisce soprattutto i bambini tra i 2 ed i 12 anni. Circa il 70% della popolazione adulta possiede anticorpi IgG acquisiti durante le prime due decadi di vita.

La manifestazione clinica nei bambini immunocompetenti che viene comunemente osservata è il megalocitemia infettiva che ha una prognosi buona.

La situazione si complica ed esige riserve per i casi di crisi aplastica transitoria in cui si produce grave anemia ad evoluzione favorevole con ripresa spontanea dell'eritropoiesi. In adulti e bambini con alterazioni immunitarie si verifica una iperplasia midollare cronica che necessita di periodiche trasfusioni.

Infine la prognosi è infausta nell'idrope fetale di cui il parvovirus è tra i possibili virus responsabili.

Nel feto viene interessato principalmente il fegato, organo dell'eritropoiesi durante la vita intrauterina causa di idrope generalizzata e spiccata anemia ad evoluzione letale.

Il parvovirus B19 e il virus dell'epatite A possono essere trasmessi da farmaci derivati dal sangue ⁽⁴⁴⁾.

VIRUS DELLA PSEUDORABBIA (PRV)

Il virus PRV è un virus della famiglia dei virus erpetici, membro della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, agente eziologico della malattia di Aujeszky.

Il suino è l'unico ospite naturale della Pseudorabbia, altri animali infettati sono i bovini, le pecore e capre, i gatti ed in rare occasioni i cavalli.

L'infezione di questi animali è letale e anche diverse specie di animali selvatici sono suscettibili all'infezione.

Il virus consiste di un nucleocapsido avvolto che circonda un genoma lineare di circa 145 kb di DNA a doppio filamento.

La struttura virale è simile a quella dell'herpes simplex, contiene proteine e lipidi, ha un diametro di 1000-2000 Å ed è relativamente labile, con virulenza soggetta a fluttuazione.

Il capsid è incorporato in una matrice proteica nota come tegumento che è circondato da un "mantello" costituito da una membrana lipidica contenente diverse glicoproteine virali.

La dimensione complessiva del virus oscilla tra 150 e 180 nm di diametro.

Il virus della pseudorabbia (PRV) rappresenta un utile modello per lo studio della biologia dell'herpesvirus avendo il genoma racchiuso in un capsid icosaedrico protettivo per formare un nucleocapsid. Dopo legame con i recettori cellulari penetra nella cellula ove, raggiunto il nucleo, inizia il ciclo di replicazione virale e dirige una cascata di espressione genica regolata che culmina con la replicazione del DNA virale e la produzione di nuovi componenti del virione.

Infine, i virioni di progenie si autoassemblano e escono dalle cellule ospiti. Ad oggi, non sono state registrate trasmissioni di herpesvirus associate all'uso di componenti del sangue non cellulari. Tuttavia, poiché vengono continuamente scoperti nuovi herpesvirus la maggior parte dei quali linfotropi, alcuni dei quali capaci di provocare una viremia, è necessario eseguire uno studio di validazione con un virus DNA provvisto di "mantello", come quello della pseudorabbia (PRV).

Gli esseri umani ospitano 3 alfa herpesvirus: il virus varicella-zoster (VZV), il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) e di tipo 2 (HSV-2).

Il PRV non viene trasmesso all'uomo.

Le informazioni derivate dallo studio del virus della pseudorabbia offrono una valida opportunità per la virologia molecolare comparativa.

Come lontano parente degli alfa herpesvirus umani, il PRV condivide una considerevole omologia genica posizionale e funzionale con HSV-1, HSV-2 e VZV, ma poca o nessuna omologia della sequenza del DNA.

La ricerca sul PRV ha già fornito una visione approfondita della biologia di base e dei meccanismi della patogenesi dell'herpesvirus in generale, evidenziando sia la natura conservata delle strategie di replicazione virale, sia il loro adattamento unico a una particolare nicchia ecologica.

Fino ad oggi non sono state registrate trasmissioni di herpesvirus associate all'uso di emocomponenti non cellulari.

È stato evidenziato che alcuni herpesvirus possono provocare una viremia, per cui è necessario eseguire lo studio di validazione con un virus del DNA con "mantello", come l'Herpesvirus della pseudorabbia⁽⁴⁵⁾.

CMV: CITOMEGALOVIRUS

Il Citomegalovirus (CMV), o herpes virus umano 5, è un virus appartenente alla famiglia degli *Herpesviridae*, sottofamiglia beta *Betaherpesviridae*, con genoma DNA a doppia elica, un capsid proteico ed un "mantello" lipoproteico, a simmetria icosaedrica con un diametro di 180-250 nm.

Il virus CMV ha una distribuzione mondiale, infetta esseri umani di tutte le età e di tutti i gruppi socioeconomici.

Tra gli herpes virus umani il Citomegalovirus ha assunto una importanza significativa nelle trasfusioni di sangue che possono trasmettere l'infezione.

Il virus, una volta penetrato, si dissemina per via ematogena e viene veicolato nei tessuti dai leucociti provocando la formazione di tipiche cellule di grandi dimensioni con inclusioni nucleari e citoplasmatiche.

La risposta dell'ospite consiste nella formazione di plasmacellule, linfociti e monociti-macrofagi.

La guarigione avviene con la comparsa di anticorpi e l'attivazione dell'immunità cellulo-mediata.

L'infezione da citomegalovirus (CMV) in soggetto immunocompetenti a seguito di trasfusione di sangue o di emoderivati infetti è molto spesso asintomatica talvolta può apparire una sindrome mononucleosica responsabile di vari tipi di malesseri tra cui febbre elevata persistente, un aumento di transaminasi accompagnato da ittero, mialgia, cefalea, malessere ed astenia che si risolve generalmente in 2-4 settimane.

La principale caratteristica consiste nella capacità del virus di rimanere latente dopo l'infezione primaria e riattivarsi a distanza di mesi e di anni.

La letteratura descrive casi clinici in cui si evidenzia la riattivazione del CMV latente in pazienti immunocompetenti sani. Le cellule che fungono da réservoir del virus durante il periodo di latenza sono principalmente i linfociti, i monociti periferici ed i granulociti.

In Italia, come nella maggior parte degli altri Paesi europei, la prevalenza della infezione si aggira intorno al 70-80% della popolazione adulta risultando positiva agli anticorpi anti-CMV.

Secondo i dati dell'Istituto Superiore di Sanità in Italia la prevalenza della infezione congenita risulta maggiore nei bambini nati da donne di età inferiore ai 24 anni rispetto alle donne di età superiore.

L'infezione trasfusionale (TT-CMV) da CMV negli individui immunocompetenti è spesso asintomatica (40-90%).

L'infezione connessa ad un emoderivato o ad una trasfusione infetta può rivestire i caratteri di notevole gravità e risultare talvolta fatale in alcune categorie quali i pazienti immunocompromessi con immunodeficienze primarie, i pazienti trapiantati, i pazienti in chemioterapia, le donne gravide e gli splenectomizzati. Nonostante l'esistenza di un'ampia variazione nelle pratiche di utilizzo di componenti leucoridotti da soli o in combinazione con i dati sierologici in alcuni studi è stato rilevato che l'infezione trasfusionale (TT-CMV) si è verificata in pazienti immunocompromessi nonostante l'uso di unità sieronegative o leucoridotte per CMV.

La trasmissione del CMV in utero può avvenire per una primaria infezione materna durante la gravidanza, per la riattivazione di una infezione latente o per una reinfezione con un ceppo virale diverso.

L'infezione contratta durante la gravidanza e trasmessa al feto può arrecare al bambino gravi danni permanenti.

Il contagio dalla madre al figlio oltre che durante la gravidanza, il parto o l'allattamento al seno e lo

stretto contatto può avvenire anche attraverso altre vie tra cui l'inalazione o l'ingestione di goccioline di saliva o di muco.

La infezione da CMV durante la gravidanza è una delle principali cause di infezione congenita in paesi in via di sviluppo con un'incidenza dello 0,2-2,4% dei nati vivi.

Un uso attento delle risorse ematiche sieronegative da CMV e la leucodeplezione sono in grado di prevenire la maggior parte delle infezioni da CMV.

La diagnosi di un'infezione da CMV richiede l'esecuzione del rilevamento degli anticorpi anti-CMV che, nel caso di infezione acuta, risultano essere della classe IgM, nel caso di infezione pregressa della classe IgG.

Alla infezione segue la disseminazione del virus per via ematogena veicolata dai leucociti formando tipiche cellule citomegaliche.

La questione della trasmissione di CMV da emoderivati è stata affrontata per la prima volta nel 1984.

Alcuni studi retrospettivi hanno dimostrato che entrambe le metodologie, in particolare l'uso di componenti del sangue CMV sieronegativi abbinati alla leucodeplezione, hanno dimostrato efficacia nel prevenire l'infezione da CMV in pazienti ad alto rischio come i pazienti trapiantati.

E' stato dimostrato che l'uso di componenti del sangue sieronegativi o leucodepleti riduce costantemente, oltre il 90%, il rischio di trasmissione di CMV.

Gli emocomponenti leucodepleti hanno dato un notevole contributo a ridurre il rischio di TT-CMV nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche confermando la sicurezza nella prevenzione del TT-CMV.

Tuttavia, la persistenza presenza del CMV DNA rilevata nei destinatari di componenti del sangue leucodepleti ha alimentato il dibattito sulla relativa sicurezza di prevenzione per l'infezione CMV trasmessa per trasfusione.

Per ovviare alla possibilità che la sola leucodeplezione o la sola sieronegatività degli anticorpi specifici anti-CMV potessero essere insufficienti ad assicurare

la prevenzione di trasmissione del CMV, è stata utilizzata una diversa strategia per cui la trasfusione di emocomponenti leucodepleti da donatori diventati anti-CMV sieropositivi da oltre 1 anno non dovrebbero essere in grado di trasmettere l'infezione.

Strategie alternative prevedono la fornitura di emoderivati sieronegativi, la fornitura di donatori di sangue sieropositivi a lungo termine e la fornitura di emoderivati negativi al DNA di CMV ^{(46) (47) (48) (49)}.

REO VIRUS TYPE 3

I virus della famiglia Reoviridae hanno genomi composti da RNA segmentato a doppio filamento (dsRNA) privi di "mantello" lipidico.

Per questo motivo la replicazione avviene esclusivamente nel citoplasma e il virus codifica diverse proteine che sono necessarie per la replica e la conversione nel genoma del dsRNA in (+) RNA.

I reovirus hanno le dimensioni sensibilmente superiori a quelle degli enterovirus con forma sferica e simmetria icosaedrica.

Sono noti 3 sierotipi che raramente determinano malattie nell'uomo.

Negli adulti sono state osservate riniti di modesta entità mentre nei neonati e bambini sono descritte enteriti e infezioni delle basse vie respiratorie.

L'infezione da Reovirus di tipo 3 (Reo-3) è stata recentemente implicata nella patogenesi di alcune malattie epatiche colestatiche idiopatiche dei neonati.

Il virus può entrare nella cellula ospite attraverso un recettore sulla superficie cellulare.

Il virus è parzialmente non rivestito dalle proteasi nell'endolisosoma, dove il capsidone viene parzialmente digerito per consentire l'ulteriore ingresso delle cellule.

La particella centrale entra quindi nel citoplasma ove il genoma viene trascritto in modo conservativo causando un eccesso di filamento di senso (+), utilizzato come modello di mRNA per sintetizzare il filamento di senso (-).

Le particelle virali iniziano a riunirsi nel citoplasma poche ore dopo l'infezione.

Il virus esce dalla cellula ospite mediante movimento virale monopartito non guidato da tubuli, movimento da cellula a cellula ed esistente nei corpi di occlusione dopo la morte cellulare e rimanendo infettivo fino a trovare un altro ospite ⁽⁵⁰⁾.

VIRUS LINFOTROPI UMANI

Sono riportati in letteratura dati sulla prevenzione delle infezioni virali causate e dai virus T-linfotropi umano (HTLV/1-2) costituiti da una classe di retrovirus oncogeni e per questo chiamati oncovirus. Entrambi si trasmettono per via ematica, attraverso rapporti sessuali non protetti, con trasfusioni o con l'allattamento.

Il genoma è costituito da ssRNA⁺ e possiede l'enzima virale *trascrittasi inversa* necessario ai fini dell'integrazione col DNA umano.

Il virus HTLV-1 può essere considerato l'agente eziologico della "leucemia acuta a cellule T" o la cosiddetta "paraparesi spastica tropicale" malattia simile alla sclerosi multipla. Il virus viene inoltre associato a tutta una serie di patologie debilitanti come la bronchiectasia, la mielopatia e la miopia.

Dopo l'infezione, il virus non sparisce mai completamente ma rimane nell'organismo in forma latente, e solo una piccola percentuale dei soggetti infetti sviluppa una delle patologie correlate.

La diagnosi differenziale di questo tipo di leucemia con altre forme maligne delle cellule T è possibile con una serie di dati di laboratorio tra cui gli anticorpi anti-HTLV-1.

Il virus HTLV-2 presenta un'omologia genetica di circa il 70% con l'HTLV-1 ed è riconosciuto come agente eziologico della *leucemia a cellule capellute oltre a paraparesi spastica*.

Dal punto di vista epidemiologico, per quanto riguarda l'HTLV/1-2, vengono attuati diversi atteggiamenti.

Nei paesi sviluppati non endemici, l'attuale bassissima incidenza tra i donatori di sangue viene conservata e garantita dalla sola leucodeplezione. Nei paesi sviluppati con aree ad alta endemicità, la leucodeplezione deve essere integrata con il rilevamento dell'anticorpo specifico fino a quando

l'efficacia della procedura nella prevenzione della trasmissione non sia provata.

Nei paesi in via di sviluppo in cui il virus HTLV è endemico ed il rischio residuo di infezione trasmessa per trasfusione è maggiore, vanno definite e valutate le strategie più efficaci oltre ad un attento sviluppo dell'emovigilanza ⁽⁵¹⁾.

VIRUS DELL'EPATITE G (HGV)

I progressi nella biologia molecolare hanno permesso di evidenziare altri virus non classificati come agenti patogeni importanti.

In relazione alle indagini scientifiche che avevano indicato la scoperta di due nuovi virus è stato successivamente dimostrato che GBV-C e HGV erano patogeni per gli uomini ed erano solo due isolati dello stesso virus. Il virus chiamato "*Hepatitis G Virus*" appartiene alla famiglia dei Flaviviridae, virus a catena DNA singola, cui è stato attribuito il ruolo eziologico di un'epatite virale il cui rilevamento è possibile con la ricerca del genoma mediante tecniche di biologia molecolare (PCR).

Sono già stati elencati diversi genotipi. Questo ruolo però è attualmente controverso nella comunità scientifica e l'opinione predominante è che questo virus non sia patogeno per gli esseri umani.

Tale osservazione è in linea con studi di follow-up eseguiti su pazienti con epatite cronica positiva di sconosciuta eziologia e su pazienti sottoposti ad emodialisi.

L'HGV è molto diffuso nella popolazione generale, con l'1-2% degli adulti portatori del virus in Europa, negli Stati Uniti ed in Cina.

La trasmissione avviene principalmente per via parenterale. Anche se il potere patogeno dell'HGV non è chiaramente stabilito, sorge la necessità di prevenzione nel contesto di trasfusioni e trapianti di organi ^{(52) (53) (54) (55)}.

VIRUS EMERGENTI

Le infezioni virali emergenti rappresentano un rischio per la salute pubblica evidenziato dalla diffusione di agenti patogeni con potenziale rischio zoonotico.

Molta attenzione viene oggi prestata alle patologie dovute al virus dell'epatite E (HEV), gli hantavirus, al virus West Nile Disease ed al virus della febbre emorragica di Crimea-Congo.

VIRUS HEV: VIRUS DELL'EPATITE E

Il virus dell'epatite E (HEV) è un agente eziologico dell'epatite in molti paesi e di crescente preoccupazione nei paesi industrializzati.

L'epatite E, finora rara e confinata ai viaggiatori provenienti da aree endemiche, è considerata emergente essendo in Italia in aumento il numero dei casi autoctoni notificati non legati a viaggi in zone endemiche.

Nei paesi in via di sviluppo l'HEV (genotipi 1 e 2) è una delle cause principali di epatite acuta, trasmessa per via fecale-orale e associata alla contaminazione del bere.

I genotipi 3 e 4 di HEV infettano non solo gli esseri umani ma anche animali come maiali, cinghiali e cervi. L'HEV è quindi responsabile di epidemie ed endemie di epatite acuta attraverso vie di trasmissione per via idrica, alimentare e zoonotica.

Le principali caratteristiche del virus HEV con genoma di 7,2 kb, privo di mantello, dalle dimensioni di 26-32 nm a simmetria cubica e RNA a singola elica con polarità positiva, lo classificano come genere nella famiglia Hepeviridae.

Gli isolati HEV sono stati ottenuti da plasma umano o feci umane, feci di suino o cinghiale, o omogenati di fegato di suino o cinghiale.

L'HEV cresce con difficoltà nelle colture cellulari in vitro e pochi sistemi risultano adatti ad ottenere titoli HEV sufficientemente elevati per lo studio delle procedure di inattivazione necessarie nel processo di fabbricazione dei prodotti derivati dal plasma.

Esistono quattro genotipi attualmente riconosciuti e due dei quattro contengono virus isolati dai suini e dall'uomo.

Indipendentemente dal paese di origine o dal genotipo del virus, la maggior parte, se non tutti i ceppi, appartengono a un singolo sierotipo.

L'infezione di questo virus è stata documentata per la prima volta nel 1955 durante un'epidemia avvenuta a Nuova Delhi, in India.

In Cina, è stato approvato nel 2012 da Xiamen Innovax Biotech un vaccino che utilizza la tecnologia del DNA ricombinante che esprime la proteina virale in *E. coli* (*Escherichia Coli*) capace di stimolare un'immunità protettiva contro l'epatite E.

Il virus (HEV) è un agente eziologico dell'epatite in molti paesi e di crescente preoccupazione in paesi sviluppati.

Nei paesi in via di sviluppo, l'HEV (genotipi 1 e 2) è una delle cause principali di epatite acuta, la cui principale via di trasmissione è acqua e cibi contaminati.

Nei paesi sviluppati, HEV (genotipi 3 e 4) è risultato essere più prevalente nella popolazione umana di quanto originariamente creduto.

La malattia è in genere acuta, spesso anitterica e autolimitante, molto simile all'epatite da HAV. In casi rari l'epatite E può risultare in una forma fulminante fino al decesso.

Le forme fulminanti si presentano più frequentemente nelle donne gravide, specialmente nel terzo trimestre di gravidanza, con letalità che arriva fino al 20%.

Seppure rari, casi cronici sono riportati in soggetti immunodepressi e, in letteratura, sono riportati anche casi di riacutizzazione.

L'infezione acquisita nei pazienti con una sottostante malattia cronica del fegato può portare a forme acute o subacute di scompenso epatico con una alta letalità.

I genotipi 3 e 4 di HEV, generalmente meno patogeni dei genotipi 1 e 2, infettano non solo gli esseri umani ma anche animali come suini, cinghiali e cervi.

La loro trasmissione zoonotica all'uomo può verificarsi per consumo di carne di maiale poco cotta e prodotti di cinghiale o per contatto con animali infetti.

L'infezione cronica da HEV è rappresentata principalmente dal genotipo 3 costituendo una preoccupazione emergente tra i destinatari di trapianto.

L'HEV è riconosciuto come agente trasmissibile nelle trasfusioni dal 2004 e sono stati documentati casi in diversi paesi (Regno Unito, Francia, Giappone, Arabia Saudita, Repubblica Popolare Cinese).

Recenti studi hanno identificato donatori positivi per l'HEV RNA sia in Europa che negli Stati Uniti.

Sono stati sollevati molti interrogativi sulla sicurezza dei medicinali derivati dal sangue essendo state trovate donazioni positive per l'HEV.

Uno standard internazionale dell'OMS per HEV RNA è stato stabilito promuovendo la standardizzazione dei dosaggi HEV mediante la tecnologia di amplificazione degli acidi nucleici (NAT).

La produzione di altri prodotti derivati dal plasma include fasi di processo per l'inattivazione/rimozione di virus senza mantello. La loro efficacia contro l'HEV è attualmente oggetto di studio.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, ogni anno nel mondo si verificano circa 20 milioni di infezioni da epatite E di cui 3,3 milioni di casi sintomatici.

Il virus HEV causa epidemie e casi sporadici di epatite acuta in molti paesi dell'Asia e dell'Africa, ma raramente causa malattie in paesi sviluppati.

Per molto tempo, l'epatite E è stata considerata come malattia del viaggiatore. La infezione da HEV non si verifica solo nelle aree endemiche classiche con un basso livello di igiene, ma anche nei paesi sviluppati ove si osservano infezioni da HEV sporadiche di solito in viaggiatori che avevano contratto l'infezione in aree endemiche.

Gli animali, principalmente i maiali, forniscono il serbatoio del virus e mostrano un tasso di infezione da HEV molto elevato.

Il rischio di una trasmissione di HEV da parte di emoderivati è attualmente stimato basso poiché sono state introdotte metodologie parzialmente efficaci nel disattivare o rimuovere l'HEV.

Una valutazione più accurata del rischio, tuttavia, non è attualmente possibile poiché non sono disponibili dati sull'epidemiologia, sul carico di HEV nel pool di plasma, sulla prevalenza di anticorpi nelle donazioni di plasma e/o pool di plasma e sulla efficienza di inattivazione/rimozione di HEV durante il processo di fabbricazione.

Queste osservazioni danno origine al presupposto che un numero considerevole di infezioni da HEV nei paesi sviluppati mostri un decorso subclinico e che queste infezioni possano essere rilevate solo mediante l'identificazione del genoma e/o sierconversione di HEV.

È stato dimostrato che gli individui durante l'incubazione e la fase clinica dell'epatite E, o con infezione subclinica, presentano viremia da HEV e che il virus possa essere trasmesso anche da donazioni di sangue di donatori infetti.

Pertanto, attualmente, non è possibile escludere in generale un rischio di trasmissione di HEV da parte di componenti del sangue. Inizialmente si riteneva che il virus avesse una distribuzione geografica limitata.

Tuttavia, studi epidemiologici suggeriscono che l'HEV, può essere endemico anche negli Stati Uniti e in Europa, anche se raramente causa malattie manifeste.

Recentemente è stato dimostrato che molte diverse specie animali in tutto il mondo hanno anticorpi contro l'HEV, suggerendo che l'epatite E può essere zoonotica.

Sebbene due ceppi correlati siano stati trasmessi sperimentalmente tra specie, la trasmissione diretta da un animale a un essere umano non è stata documentata.

Nei paesi sviluppati il genotipo 3 HEV è stato osservato nelle donazioni di sangue da donatori spesso asintomatici.

Il genotipo 3 HEV è considerato una minaccia per le persone immunocompromesse.

Infezioni di esseri umani e suini con genotipo 3 HEV sono molto diffuse in Europa.

Data la mancanza di screening dei donatori di sangue esiste un'alta probabilità che le donazioni viremiche entrino nei pool di plasma.

Sebbene i carichi viremici siano spesso bassi o moderati, talvolta in singole donazioni sono state osservate alte concentrazioni di HEV RNA.

Tuttavia, lo screening dei pool di plasma per HEV RNA non è attualmente considerato necessario in quanto le linee guida sui medicinali derivati dal plasma contengono almeno una fase efficace contro i virus non avvolti come HEV.

Il genotipo 3 di HEV è stato osservato nelle donazioni di sangue/plasma da donatori asintomatici in paesi in fase di sviluppo.

Le infezioni di esseri umani e suini con genotipo 3 HEV sono diffuse in Europa.

Alcune fluttuazioni dell'incidenza è stata osservata in passato ed è difficile prevedere la futura epidemiologia.

Tuttavia, considerando l'ampia distribuzione del virus zoonotico nei suini e l'assenza di rigorose misure di salute degli animali per ridurre l'HEV nei suini, non ci si può aspettare che la situazione migliorerà notevolmente nel prossimo futuro.

Lo screening dello RNA HEV nei pool di plasma per il frazionamento non è attualmente ritenuto necessario poiché le procedure di frazionamento del plasma contengono almeno una fase efficace di inattivazione/rimozione contro i virus senza involucro come l'HEV.

Tuttavia, la loro efficacia contro HEV non è attualmente del tutto chiara.

L'HEV è difficile da coltivare e le attuali informazioni sulla suscettibilità dell'HEV alle fasi di inattivazione /rimozione del virus utilizzate nella produzione di medicinali derivati dal plasma sono scarse ^{(56) (57) (58) (59) (8)}.

WEST NILE DISEASE (WND)

Il virus West Nile Disease è un virus a RNA a filamento singolo con polarità positiva con un mantello di circa 11 kb.

I ceppi di WNV sono stati classificati in almeno sette linee genetiche ma solo le linee 1 e 2 sono state associate a focolai significativi nell'uomo.

Il virus del Nilo occidentale (WNV) è un patogeno neurotropico, appartenente al genere *Flavivirus* della famiglia *Flaviviridae*.

La Febbre del Nilo Occidentale è una malattia causata dal virus WNV che alberga negli uccelli selvatici. Le zanzare si infettano pungendo uccelli viremici, sia migratori che stanziali, che rappresentano il serbatoio del virus e trasmettono il virus attraverso le punture ad altri uccelli e ad ospiti occasionali come animali sensibili quali i cavalli e l'uomo che comunque non può contagiare attraverso il contatto diretto altre persone.

I vettori sono zanzare del genere *Culex* di specie *modestus* e *pipiens*. In assenza di un trattamento specifico per l'infezione la sintomatologia dei casi meno gravi può essere trattata con farmaci antinfiammatori e antipiretici mentre nelle forme gravi è necessario il ricovero ospedaliero al fine di fornire un supporto alle funzioni vitali eventualmente compromesse.

Per l'uomo, anche se con scarsa possibilità, sono documentati altri mezzi di trasmissione della infezione quali le trasfusioni di sangue, la trasmissione materno-fetale in gravidanza e trapianti di organi.

Il virus della Febbre del Nilo non circola tutti gli anni, tuttavia quando è presente ha un andamento stagionale: divampa in estate, quando le popolazioni di zanzare sono maggiori e continua ad essere presente fino all'autunno inoltrato.

Negli allevamenti di cavalli in cui è stata accertata la presenza del virus è vietata la movimentazione senza autorizzazione della ASL competente.

Tuttavia, per motivi precauzionali, è consigliabile non consentire l'ingresso di cavalli, provenienti da altre zone, nel perimetro di quelle sottoposte a restrizione ^{(60) (61)}.

HANTAVIRUS

Gli Hantavirus sono importanti patogeni zoonotici membri della famiglia degli Hantaviridae, all'interno dell'ordine Bunyavirales, che comprende molti virus di importanza agricola, medica e veterinaria.

Gli hantavirus hanno forma rotondeggiante dal diametro di 95-110 nm contenenti un genoma virale costituito da RNA tripartito a filamento negativo comprendente tre segmenti: un segmento piccolo da 1,8-2,1 kb, un segmento medio da 3,7-3,8 kb e un segmento grande da 6,5-6,6 kb.

Gli hantavirus vengono mantenuti e trasmessi attraverso molti serbatoi ospiti di mammiferi tra cui i pipistrelli (ordine Chiroptera), i toporagni, le talpe (Soricomorpha) ed i roditori (ordine Rodentia).

Il virus è trasmesso prevalentemente da roditori e riconosciuto come causa di manifestazioni cliniche dissimili. In Europa ed in Asia prevale la febbre emorragica con sindrome renale mentre nell'emisfero occidentale prevale la sindrome polmonare.

La diffusione di tale infezione probabilmente potrebbe in futuro aumentare a causa del cambiamento climatico e della deforestazione che causa un aumento delle popolazioni di roditori, portandoli in stretta prossimità con gli insediamenti umani.

Attualmente non esistono vaccini o terapie approvati dalla FDA contro la febbre emorragica con sindrome renale o sindrome polmonare a causa di una compressione limitata del ciclo di vita virale, dei ruoli specifici dei fattori dell'ospite e dei meccanismi di ingresso cellulare.

Sebbene la scoperta di hantavirus che causano sindrome polmonare negli anni '90 abbia notevolmente accelerato gli studi, i ruoli specifici dei fattori dell'ospite e i dettagli dei meccanismi di ingresso cellulare rimangono scarsamente caratterizzati.

La conferma della diagnosi di febbre emorragica viene eseguita mediante test sierologici e/o RT-PCR. Attualmente non è disponibile alcun trattamento efficace né per la sindrome renale né per la sindrome cardiopolmonare.

Sono stati prodotti ed autorizzati per l'uso vaccini inattivati da virus interi nella Repubblica di Corea e in Cina, ma l'efficacia protettiva di questi vaccini è ancora incerta ^{(62) (63) (64)},

FEBBRE DI CONGO E CRIMEA

La febbre virale emorragica Congo-Crimea è provocata da un virus del genere Nairovirus appartenente alla famiglia dei Bunyaviridae.

Il virus si trasmette all'uomo sia attraverso le zecche, sia con il contatto diretto con tessuti, sangue o altri fluidi corporei provenienti da animali infetti.

La maggior parte dei casi si sono verificati in persone impiegate negli allevamenti, come i lavoratori agricoli, gli addetti ai macelli e i veterinari.

La malattia nell'uomo è piuttosto grave ed ha un'elevata letalità con un tasso di mortalità è circa del 30%.

Il genoma virale è un RNA monocatenario segmentato a polarità negativa.

Il virione ha forma sferoidale delle dimensioni di circa 100 nanometri per cui la diagnosi della malattia viene eseguita con un'anamnesi che tenga in considerazione i recenti viaggi del paziente e trova il suo metodo diagnostico di elezione nella metodologia molecolare ⁽⁶⁵⁾.

I DERIVATI DEL PLASMA

I prodotti derivati dal plasma umano possono generalmente essere divisi in due gruppi:

Il primo gruppo riguarda i prodotti derivati da singole donazioni o da piccoli pool costituiti da un numero di donatori inferiori a 12 e sono soggetti a una o poche procedure di separazione.

Questi prodotti, come il plasma fresco congelato e i crioprecipitati sono prodotti e distribuiti da istituti di raccolta del sangue e utilizzati nella medicina trasfusionale.

La loro qualità e sicurezza dipende quasi esclusivamente dall'attenta selezione e controllo dei donatori, dalla selezione delle donazioni e dalle misure adottate per ridurre al minimo la contaminazione.

Il secondo gruppo è rappresentato da derivati del plasma e raccolto in alcuni centri da pool ottenuto con varie procedure di produzione e utilizzato principalmente per la produzione di emoderivati su scala industriale.

Possono essere usati come medicinali terapeutici o come eccipienti i seguenti prodotti la cui qualità e sicurezza fa affidamento sulla selezione dei donatori, sullo screening dei materiali di base e sulla scelta e il controllo dei processi produttivi compresi i processi che inattivano o rimuovono i microbi contaminanti. Il plasma ottenuto dalla plasmaferesi viene raccolto in alcuni centri e utilizzato principalmente per la produzione di emoderivati su scala industriale.

I derivati del plasma possono essere usati come medicinali terapeutici o come eccipienti. La qualità e la sicurezza di questi prodotti fanno affidamento sulla selezione dei donatori, sullo screening dei materiali di base e sulla scelta e il controllo dei processi produttivi.

I prodotti di rilievo sono costituiti da:

- albumina,
- immunoglobuline
- fattori della coagulazione

ALBUMINA

Data la necessità di unire in *batch* le singole donazioni prima della lavorazione, il plasma proveniente da migliaia di donatori viene sottoposto alle procedure di rimozione e inattivazione virale.

Le donazioni di sangue intero vengono raccolte presso gli istituti di raccolta del sangue e vengono usate per preparare prodotti emoderivati.

Una parte del plasma viene utilizzato per il frazionamento su scala industriale.

Tutti i prodotti devono essere conformi alle monografie europee appropriate della farmacopea europea.

Se vengono usati metodi diversi, devono essere forniti i risultati per dimostrare la loro equivalenza sui prodotti finali in ogni lotto e dimostrare la loro conformità alle norme europee.

L'albumina, sintetizzata dal fegato, è la proteina maggiormente presente nel plasma.

Le più importanti funzioni fisiologiche dell'albumina derivano dal suo contributo alla pressione oncotica del sangue e alla funzione di trasporto di metaboliti come acidi grassi liberi, ormoni tiroidei, bilirubina, medicinali.

La separazione dell'albumina si effettua in condizioni controllate di pH, forza ionica e di temperatura in modo che almeno il 95% delle proteine totali sia costituito da albumina.

L'albumina ottenuta tramite processo di frazionamento che include la pastorizzazione terminale a 50°C per 10 ore per inattivare i virus secondo la monografia della farmacopea europea ha un eccellente record di sicurezza virale.

Il caprilato sodico e l'acetiltriptofano sono spesso usati come stabilizzanti che si legano all'albumina per impedire la denaturazione e l'aggregazione durante il trattamento al calore ma non può essere aggiunto nessun conservante antimicrobico ad alcun stadio della preparazione.

L'albumina preparata secondo le norme della farmacopea europea non ha mai trasmesso infezioni ed il rischio per l'albumina umana comunemente utilizzata come stabilizzante nei prodotti vaccinali umani in piccole quantità è stimato molto basso.

La evidenza maggiore emerge dai risultati epidemiologici secondo cui non ci sono segnalazioni di trasmissioni di virus con albumina.

Gli studi pubblicati hanno dimostrato che il processo di produzione, che prevede trattamento termico al calore, è in grado di eliminare ogni infettività residua. Si raccomanda comunque che ogni volta che un determinato prodotto viene somministrato a un paziente, di registrare il nome e numero di lotto al fine di mantenere un collegamento tra il paziente e il lotto del prodotto.

L'albumina umana può essere somministrata direttamente per via endovenosa con velocità di infusione regolata in base alle circostanze individuali e alle indicazioni cliniche.

IMMUNOGLOBULINE

La immunoglobulina umana normale è una preparazione liquida o liofilizzata contenente immunoglobuline, principalmente immunoglobuline G (IgG) ed, eventualmente, altre proteine, erogata dal Servizio Sanitario Nazionale, attraverso le farmacie ospedaliere o le singole ASL.

L'immunoglobulina umana normale contiene gli anticorpi IgG di soggetti normali.

Essa va iniettata solo per via intramuscolare ed è preparata a partire da una miscela di plasma proveniente da almeno 1000 donatori mediante un metodo in grado di dare un prodotto che non trasmetta infezioni e che, alla concentrazione proteica di 160 g/l, contenga una quantità di anticorpi almeno 10 volte superiore a quella contenuta nella miscela iniziale ⁽⁶⁶⁾.

Le misure adottate hanno come obiettivo finale quello di garantire, a seguito della loro somministrazione, l'assenza di trasmissione di infezioni di virus con mantello come l'immunodeficienza umana virus (HIV1,2), virus dell'epatite B (HBV) e virus dell'epatite C (HCV) mentre possono avere un valore limitato contro i virus senza mantello come il virus dell'epatite A ed il parvovirus B19.

Vanno inoltre considerati altri virus quali il Citomegalovirus e il Virus Epstein Barr. Esiste un'esperienza clinica rassicurante per quanto riguarda la mancanza di trasmissione dell'epatite A o del parvovirus B19 con immunoglobuline e si presume che il contenuto di anticorpi neutralizzanti nel prodotto fornisca un importante contributo alla sicurezza virale.

Tuttavia la possibile trasmissione di virus sconosciuti o emergenti che presentano fasi di viremia durante il loro ciclo patogenetico o la diminuzione dei titoli anticorpali a livelli non protettivi in pool di donatori non possano essere totalmente esclusi.

Le immunoglobuline intramuscolari prodotte con il metodo di Edwin Cohn, che separa la frazione contenente gli anticorpi che neutralizzano vari agenti infettanti eventualmente presenti, hanno un buon record di sicurezza.

Da più di 55 anni molti milioni di persone nel mondo le hanno ricevute senza contrarre infezioni. La sicurezza delle preparazioni di gammaglobuline intramuscolari, prodotte con il metodo di Edwin Cohn, anche se da un pool di plasma HCV RNA positivo, può essere attribuita (a) alla inattivazione dei virioni attraverso il processo di frazionamento (b) alla separazione dei virioni dalle gammaglobuline (c) alla alta concentrazione degli anticorpi neutralizzanti.

Non è documentata in letteratura alcuna epidemia di infezione nonA-nonB/HCV positivo.

Non tutte le opinioni sono comunque concordi nel senso che esistono anche convinti sostenitori della tesi contraria la quale afferma essere possibile, anche se sporadicamente frequente, un rapporto causale tra l'assunzione di immunoglobuline intramuscolari ed un contagio con virus epatitici.

Anche se non si può escludere in assoluto che qualche singolo episodio di infezione da HBV causata da gammaglobuline intramuscolo iperimmuni possa essersi verificato, non risulta documentata in letteratura scientifica alcun caso di epidemie di infezione di epatite B successiva a immunoglobuline specifiche come, ad esempio, le antitetaniche intramuscolo. Negli anni 70 esistevano 70 produttori di immunoglobuline umane e 30 di questi producevano immunoglobuline anti-D.

La sicurezza di queste immunoglobuline preparate con sangue non testato, era generalmente attribuita al particolare metodo di frazionamento con etanolo freddo (frazione II).

In tali anni si sono verificati due episodi di trasmissione dell'infezione HCV da immunoglobuline specifiche anti-D infette, uno in Irlanda e l'altro in Germania.

La ragione dei due episodi epidemici, molto verosimilmente era stata dovuta al particolare metodo di preparazione utilizzato, diverso da quello di Edwin Cohn, esattamente con un metodo di frazionamento del plasma umano chiamato "cromatografia a scambio ionico" che si è rivelato non sicuro ed incapace di impedire l'infezione delle gammaglobuline anti-D prodotte.

Nel 1994 in Irlanda sono state identificate 795 donne infettate su di un totale di 21.603 controllate che avevano ricevuto tali gammaglobuline specifiche negli anni 1977-1979.

La causa della infezione era stata trovata nella presenza di una singola donazione risultata HCV RNA positiva nel pool di plasma dal quale erano state prodotte 4062 fiale di gammaglobuline specifiche anti-D destinate alla somministrazione intramuscolare e presumibilmente utilizzate da 3951 donne poiché alcune avevano ricevuto dosi multiple.

E' stato rilevato che la maggior parte delle donne che 17 anni prima avevano ricevuto gammaglobuline contaminate da HCV avevano una lieve o moderata infiammazione epatica, circa la metà di queste avevano anche fibrosi ed il 2% di queste una probabile o definitiva diagnosi di cirrosi (67,68).

Diversa è invece la situazione per quanto concerne le immunoglobuline per uso endovenoso.

Dal 1983 al 1993 si sono verificate almeno 8 epidemie di infezione nonA-nonB/HCV. Sette al di fuori degli Stati Uniti ed 1 negli Stati Uniti, in soggetti che avevano ricevuto immunoglobuline per via endovenosa.

Nel "Ad Hoc Working Party on Biotechnology/pharmacy Sub-group on Medicinal Products Derived from Human Blood or Plasma" è pubblicato che "La trasmissione di virus con immunoglobuline per uso endovenoso è ben documentata mentre non è documentata per immunoglobuline intramuscolari. Non è conosciuta la ragione della sicurezza della gammaglobuline intramuscolari".

In conclusione le immunoglobuline anti-D preparate negli anni 70 con metodo diverso da quello di Edwin Cohn sono state in grado di trasmettere l'infezione mentre l'evidenza scientifica suggerisce che le immunoglobuline in generale e le anti-D in particolare prodotte con metodo di Edwin Cohn sono sicure.

Per questa ragione le immunoglobuline intramuscolari sono state definite sicure dai Centers for Disease Control (CDC) di Atlanta e dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Il dibattito aperto sulla potenziale capacità delle gammaglobuline a trasmettere l'infezione ha indotto il Consiglio Superiore di Sanità, nella seduta del 24 maggio 1990, a precisare che in "base alle esperienze svolte ed allo stato attuale delle conoscenze scientifiche nessun prodotto e nessuna trasfusione possano ritenersi completamente sicuri e quindi la loro utilizzazione debba essere guidata da criteri di reale necessità.

Non esiste infatti né può esistere un rischio zero che assicuri la totale assenza di virus da tali prodotti".

Le immunoglobuline hanno trovato un uso clinico di rilievo nella terapia salvavita delle immunodeficienze primitive a prevalente difetto dell'immunità umorale, e nella terapia di supporto al trapianto di midollo osseo per le forme di immunodeficienza combinata, umorale e cellulare.

In questi ultimi anni, vi è stato un ritorno alla somministrazione delle Ig per via sottocutanea reso possibile dalla commercializzazione di prodotti specificamente preparati.

La disponibilità di pompe da infusione di piccole dimensioni, la possibilità di somministrare questi preparati a domicilio accompagnata da livelli costanti di somministrazione senza il picco iniziale come per via endovenosa, in assenza di effetti collaterali, hanno contribuito alla loro aumentata diffusione.

Il trattamento sostitutivo controlla le infezioni gravi quali le sepsi e le encefaliti da enterovirus, ma non esercita un controllo ottimale delle infezioni a livello mucoso.

Durante il follow-up, nonostante un appropriato trattamento sostitutivo, erano le gastroenteriti, le bronchiti ed in particolare le broncopolmoniti responsabili dello sviluppo di pneumopatia cronica per cui è stata evidente la necessità di associare alla terapia sostitutiva con immunoglobuline la fisioterapia respiratoria.

Il trattamento sostitutivo con Ig rappresenta la terapia elettiva e salvavita delle immunodeficienze primitive a prevalente difetto dell'immunità umorale, mentre per le forme di immunodeficienza combinata (umorale e cellulare) questo trattamento è di supporto al trapianto di midollo osseo.

Tali considerazioni valgono per l'agammaglobulinemia, ma non per l'immunodeficienza comune variabile, condizione che, a differenza dell'agammaglobulinemia può associarsi alla presenza di IgA che possono svolgere un parziale ruolo protettivo a livello delle mucose, consentendo di controllare gli episodi infettivi più frequenti quali le gastroenteriti e le bronchiti e broncopolmoniti, responsabili dello sviluppo di pneumopatia cronica, che rappresentano la maggior causa di morte di questi pazienti.

Inoltre la somministrazione domiciliare sottocutanea di 100 mg/kg/settimana, equivalente al dosaggio di 400 mg/kg/mese del preparato per via endovenosa è risultata economicamente vantaggiosa per il servizio sanitario nazionale, consentendo di risparmiare ⁽⁶⁹⁾ ⁽⁷⁰⁾.

FATTORI DI COAGULAZIONE

Le coagulopatie emorragiche congenite ereditarie sono un gruppo di malattie rare causate da carenza quantitativa o qualitativa di uno o più proteine prodotte dal fegato coinvolte nella coagulazione del sangue.

L'emofilia A, l'emofilia B e la malattia di von Willebrand (vWD) sono le malattie più frequenti caratterizzati dalla carenza del fattore VIII (FVIII) nell'emofilia A, del fattore IX nell'emofilia B (FIX) ed il fattore di von Willebrand nella malattia di von Willebrand.

L'emofilia, nelle due varianti A e B, è una malattia della coagulazione i cui geni responsabili della sintesi dei fattori VIII e IX sono situati sul cromosoma X per cui la malattia viene trasmessa dalle femmine che ne possono essere portatrici sane e colpisce quasi esclusivamente i maschi.

Le carenze degli altri fattori della coagulazione tra cui il fibrinogeno, la protrombina ed il fattori V, VII, X, XI e XIII sono molto più rare. In particolare l'emofilia di tipo A è una malattia che comporta la riduzione parziale o totale dell'attività del fattore VIII causando un'alterazione del processo di coagulazione del sangue esponendo i pazienti ad un rischio di episodi emorragici sia interni che esterni che, delle forme più gravi, hanno spesso sanguinamenti spontanei, emartrosi e compromissione della funzionalità articolare.

La patologia richiede una terapia sostitutiva consistente in infusioni endovenose di prodotti contenenti i fattori della coagulazione derivati dal plasma o ricombinanti o anche plasma fresco congelato contenente entrambi i fattori VIII e IX o concentrati liofilizzati di fattore II, VII, IX, XI avente azione antiemorragica (complesso protrombinico).

Il fattore VIII può essere somministrato sotto forma di concentrato purificato di fattore VIII, ricavato da donatori multipli. L'incidenza delle due forme di emofilia è di 1:5.000 e di 1:30.000 nati maschi per il tipo A e per il tipo B, rispettivamente. In rapporto all'entità della carenza dei fattori VIII e IX, si distinguono forme gravi a rischio di emorragie potenzialmente letali, forme moderate e forme lievi.

Prima del 1960, il plasma era l'unico ritrovato terapeutico per il trattamento degli emofilici. Attualmente sono disponibili diversi concentrati di prodotti al plasma purificato e inattivato in vari modi.

Dopo segnalazioni casuali di un'incidenza relativamente alta seguita alla somministrazione di fattori di coagulazione derivati dal plasma umano sia della formazione di anticorpi neutralizzanti che agiscono da inibitori impedendone il corretto funzionamento poiché il sistema immunitario riconosce il fattore VIII come estraneo sia a segnalazioni di infezioni virali (epatite C, epatite A e HIV), le autorità di regolamentazione sono state rese più consapevoli dei potenziali rischi di questi prodotti.

La sicurezza dei prodotti ricombinanti per quanto riguarda la contaminazione virale può essere garantita dall'applicazione di test antivirus all'interno del processo produttivo e dall'implementazione delle fasi di inattivazione e rimozione.

Le attuali procedure applicate sono efficaci contro virus con mantello come l'HIV e l'epatite B e C ma di valore limitato contro virus senza mantello come l'epatite A e il parvovirus B19.

La somministrazione di specialità medicinali preparate da sangue o plasma umano non può

escludere in assoluto la possibilità di trasmissione di un'infezione sia di virus conosciuti che di altri tipi di agenti infettivi, emergenti o sconosciuti che stabiliscono una viremia.

Le misure di sicurezza virale adottate nella preparazione dei i fattori della coagulazione sono basate sulla qualità del materiale di partenza ed includono un'attenta selezione dei donatori in base alla storia clinica ed i dati della sorveglianza epidemiologica della popolazione di appartenenza ^{(7) (8)}.

Già in data 16 marzo 1994 a seguito di infezioni trasmesse dai fattori della coagulazione il Committee for Proprietary Medicinal Products (EMA) aveva comunicato il seguente documento sui medicinali derivati da sangue o plasma umano "Quando vengono somministrati medicinali preparati da sangue umano o plasma, le malattie infettive dovute alla trasmissione di agenti infettivi non possono essere totalmente escluse.

Il rischio che tali prodotti trasmettano un agente infettivo è stato ridotto sottoponendo a screening i donatori di plasma per l'esposizione preventiva a determinati virus, testando la presenza di alcune attuali infezioni virali e disattivando e/o rimuovendo determinati virus.

Nonostante queste misure, tali prodotti possono ancora potenzialmente trasmettere malattie".

La sicurezza dei prodotti rispetto ai virus senza mantello è di non semplice adeguata valutazione negli studi clinici.

Per questi motivi si rileva che i fattori di coagulazione sono particolarmente studiati per lo sviluppo di metodi atti ad escludere virus senza mantello molto resistenti ai metodi fisico-chimici usati per l'inattivazione virale che possono essere trasmessi ai riceventi dei fattori della coagulazione ^{(71) (72) (73)}.

BIBLIOGRAFIA

1. ISTISAN ISS Validazione virale nella produzione di emoderivati 93/29: 99-104.
2. Hyper HEP B S/D Rev September 2012 Drugs.com.
3. Piazza M Immunoglobulin transmits hepatitis C true or false? *Hepatology* 1999; 29: 299-300.
4. Grazzini G; Centro Nazionale Sangue ISS Linee guida per l'adozione di ulteriori misure per la sicurezza del sangue e degli emocomponenti; 2014.
5. Hilfenhaus J et al; Analysis of human plasma products: polymerase chain reaction does not discriminate between live and inactivated viruses *Transf* 1997; 37:935-40.
6. Plebani A et al; "Terapia con immunoglobuline: indicazioni. Modalità di somministrazione e meccanismi di azione" 2013; 43: 215-24.
7. European Medicines Agency "Guideline on plasma-derived medicinal products" 21 July 2011, EMA/CHMP/BWP/706271/2010 Committee for medicinal products for human use (CHMP).
8. European Medicines Agency "Reflection paper on viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to Hepatitis E virus" 23 June 2016 EMA/CHMP/BWP/723009/2014 Committee for medicinal products for human use (CHMP).
9. Gröner A Broumis C Fang R et al; Effective inactivation of a wide range of viruses by pasteurization. *Transf* 2016; 56: 41-51.
10. Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products, 12 October 2017 EMA/CHMP/BWP/144533/2009 rev.2.
11. EMA/CHMP/BWP/126802/2012 Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on the adventitious agent safety of urinederived medicinal products. 26 May 2015.
12. Omura H, Liu F, Shimakami T al Istituzione e caratterizzazione di una nuova linea cellulare permissiva per l'infezione da virus dell'epatite C. *Sci Rep* 2019; 9(1),7943.
13. F. Barin: Virus et ATNC; Le point sur la transmission pur le sang. *Transf Cl* 2000; 7 Suppl 1: 5-10.
14. Lalazar G, Rund D, Shouval D: Screening, prevention and treatment of viral hepatitis in patients with haematological malignancies. *BJH* 2007; 136: 699-712.
15. Verrier ER, Colpitts C C, Schuster C et al; Modelli di coltura cellulare per l'indagine sull'infezione da virus dell'epatite B e D, *Virus* 2016; 8: 261-70.
16. Rizzetto M, Canese M G, Aricò S et al; Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated with hepatitis B virus in liver. *Gut* 1977; 18(12): 997-1003.
17. Wirz M La sicurezza delle immunoglobuline. Roma ISS, 14-12-2011.
18. Candotti D, Laperche S: Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? Open access: *Frontiers in Medicine* February 2018; 5: 1-10.
19. Raimondo G et al; Statements from the Taormina expert on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2008; 49: 652-657.
20. J Martinez Gonzales, J.L.Lledo Navarro, E. Rodriguez de Santiago, A.A. Martinez; "Diagnosis and Management of occult hepatitis B virus Infection: a short review *EMJ Hepatol* 2015; 3(1): 63-9.
21. Pezzella M, Castrica R; "Epatite B occulta" *Diagnostica BIOS* 2016; 3: 26-31.
22. Dos Santos A et al: Development of cost-effective real-time PCR test to detect a wide range of HBV DNA concentrations in the western Amazon region of Brazil. *Virology* 2014; 11: 1-6.
23. Brunetto MR et al; Epatite da virus B (HBV): virologia, meccanismi di replicazione virale, patogenesi del danno epatico in "Epatiti Virali" Piccin 1993.
24. Wei Ning Chen, Chong Jim Oon; Epatitis B virus surface antigen HBsAg mutants in singapore adults and vaccinated children with high anti-hepatitis B virus antibody levels but negative for HBsAg, *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2793-4.
25. Raimondo G et al; "Occult HBV infection" *Semin Immunopathol* 2013 ; 35: 39-52.
26. Cacciola I et al; Occult hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis C liver disease. *NEJM* 1999; 341: 22-6.
27. Brechot C et al Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen. Clinically significant or purely "occult"? *Hepatology* 2001; 34: 194-203.
28. McDonald AB, Dzik WH; Leucodeplezione, La Trasfusione del sangue 2001; 46: 347-61.
29. Dzik S et al *Transfus Med Rev; Leukocyte Reduction of blood components: Public policy and new technology* 2000; 14: 34-52.
30. Illeni MT La leucodeplezione: perché, La Trasfusione del Sangue, 1999; 44: 1-7.
31. Singh SmKumar A; Leukocyte depletion for safe blood. *Biotechnol J* 2009; (8): 1140-51.
32. Col Kumar H, Lt Col PK Gupta, Lt Col DK Mishra et al; Leucodepletion and blood Products" *MJAFI* 2006; 62 : 174-7.
33. ESA DIA giugno 2003: NAT per HBV DNA: sviluppo e utilizzo dello standard internazionale.
34. Machado MO, Oriolo G, Bortolato B, et al; Biological mechanisms of depression following treatment with interferon for chronic hepatitis C: a critical systematic review. *J Affect Disord* 2017; 209: 2835-45.
35. Schaefer M, Capuron L, Friebe A, et al; Hepatitis C infection, antiviral treatment and mental health: a European expert consensus statement. *J Hepatol* 2012; 57: 1379-90.
36. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ et al; Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome *Science* 1989; 244: 359-62.
37. Muchmore E, Popper H, Peterson DA, et al; Non-A, non-B hepatitis-related hepatocellular carcinoma in a chimpanzee. *J Med Primatol* 1988; 17 (5): 235-46.
38. Shoukry NH, Sidney J, Sette A, Walker CM; Conserved hierarchy of helper T cell responses in a chimpanzee during primary and secondary C virus infection *J Immunol* 2004; 172: 483-492.
39. Ding CB, Zhang JO, Zhao Y et al "Zebrafish as a potential model organism for drug test against hepatitis C virus" *PLoS One* 6(8) e22921.
40. M Pezzella, M Ferrazzi, E Sturchio, N Vonesch; Rilevamento del genoma del virus dell'epatite C nei linfociti periferici di soggetti infetti mediante ibridazione in situ. *Clin Biochem* 1998; 22(4): 210-4.
41. Pezzella M, Luzi G, Vullo V; Sincizi formati in infezione da HIV: immagini rivelatrici *Diagnostica Bios* 2011; 4: 11-5.
42. In Seop Kim, Ho Gueon Eo, Chan Woo Park, Chong E. Chang & Soungmin Lee "Removal and inactivation of human immunodeficiency virus (HIV-1) by cold ethanol fractionation and pasteurization during the manufacturing of albumin and immunoglobulins from human plasma" *Biotechnol. Bioprocess Ing.* 6, 25 (2001).

43. Collier MG, Noe P, Nelson NP *Hepatitis A Virus: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases (Fifth Edition)*, 2018.
44. Kontomanolis EN, Fasoulakis Z; *Hydrops Fetalis e Parvovirus B - 19 Curr Pediatr Rev.* 2018; 14 (4): 239-52.
45. G, Lu J, Zhang W, Fu G, Gao G; *Pseudorabies virus: a neglected zoonotic pathogen in humans? Emerg Microbes Infect.* 2019; 8 (1): 150-4.
46. Suo M, Ekladios A, Sahebolamri M, Williams-Wyss O. *Acute CMV hepatitis in an immunocompetent patient, BMJ* 2020; 13 (12): e234811.
47. Nancy M Heddle NM, Michael Boeckh M, Brenda Grossman B et al; *Committee Report: reducing transfusion-transmitted cytomegalovirus infections, Transfusion* 2016; 56:1581-7.
48. Paul F Lindholm, Kyle Annen, Glenn Ramsey; *Approaches to minimize infection risk in blood banking and transfusion practice, Infect Disord Drug Targets* 2011;11(1):45-56.
49. Alghalibi SMS, Abdullah QYM, Al-Arnoot S, Al-Thobhani A; *Seroprevalence of Cytomegalovirus among Pregnant Women in Hodeidah city, Yemen. J Hum Virol Retrovirol* 2016; 3(5): 00106.
50. Gerald Y. Minuk G, Pollock and Uhanova J; *Adult idiopathic cholestasis: a condition more common in the Canadian Inuit? Int J Circumpolar Health.* 2017; 76(1).
51. Olindo S, Jeannin S; *Manifestazioni neurologiche associate al virus HTLV-1 EMC - Neurologia* 2014;14:1-14.
52. Barrière E; *Virus de l'hépatite G: état actuel des connaissances Revue Française des Laboratoires* 199; 95-100.
53. Grassi M, Raffa S, Traditi F, et al; *Detection and clinical evaluation of GBV-C/HGV in plasma from patients with chronic hepatitis of unknown etiology. Clin Ter* 2000; 151(4): 241-5.
54. Grassi M, Mammarella A, Sagliaschi G; *Persistent hepatitis G virus (HGV) infection in chronic hemodialysis patients and non-A, non-B non-C chronic hepatitis. Clin Chem Lab Med* 2001; 39(10): 956-60.
55. Wang T, Chen J, Q Zhang, et al; *Prevalence of hepatitis G virus infection among 67,348 blood donors in mainland China. BMC Public Health.* 2019; 19: 685. Published online.
56. Tosti ME, Alfonsi V; *Epatite E in Italia: sorvegliata speciale attraverso il Seieva, Epicentro, ISS,* 2018: 13.
57. Emerson SU, Purcell RH; *Hepatitis E virus. Rev Med Virol.* 2003;13(3):145-54.
58. *Reflection paper on viral safety of plasma-derived medicinal products with respect to Hepatitis E virus* 23 June 2016 EMA/CHMP/BWP/723009/2014 Committee for medicinal products for human use (CHMP).
59. Wu X, Chen P, Lin H, Hao X, Liang Z; *Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine. Hum Vaccin Immunother.* 2016;12(10):2603-2610.
60. Soha R Youssef SR, Eissa DG *Seroprevalence of anti-WNV IgG antibodies and WNV-RNA in Egyptian blood donors. J Med Virol* 2017; 89(8): 1323-9.
61. Pervanidou D, Detsis M, Danis K et al; *West Nile virus outbreak in humans, Greece, 2012: third consecutive year of local transmission Euro Surveill.* 2014;19(14):pii/20766.
62. Mittler E, Dieterle ME, Kleinfelder L et al; *Hantavirus entry: Perspectives and recent advances Adv Virus Res.* 2019; 104:185-224.
63. Vonesch N, Binazzi A, Bonafede M et al; *Infezioni virali zoonotiche emergenti di importanza per la salute del lavoro. Pathog Dis* 1 marzo 2019;77(2).
64. Liu R, Ma H, Shu J et al; *Vaccines and Therapeutics Against Hantaviruses. Front Microbiol.* 2019; 10: 2989.
65. Ayatollahi J, Shahcheraghi SH and Mahmood Mirjalili; *Report of nine cases of Crimean-Congo haemorrhagic fever From Iran Niger Med J.* 2015;56(2):156-9.
66. *Emoderivati. Profili normativi II Edizione Gruppo Emoderivati Farindustria* 1996 vol I : 41-5.
67. Kenny-Walsh E; *Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin. Irish Hepatology Research Group. N Engl J Med* 1999; 340: 1228-33.
68. Lawlor E, Columb G; *Clinical outcomes from contaminated anti-D immune globulin N Engl J Med* 1999; 741(10): 762.
69. Quinti I, Soresina A, Guerra A et al; *Effectiveness of Immunoglobulin Replacement Therapy on Clinical Outcome in Patients with Primary Antibody Deficiencies: Results from a Multicenter Prospective Cohort Study. J Clin Immunol* 2011;31:315-22.
70. Haddad E, Barnes D, Kafal A; *Home therapy with subcutaneous immunoglobulins for patients with primary antibody deficiencies. Transfus Apher Sci* 2012; 46: 315-21.
71. *Commission of The European Communities Committee for Proprietary Medicinal Products Brussels* 16 March 1994 : *Background Documents on medicinal products derived from human blood or plasma. Emoderivati vol. 1- pag* 313-5.
72. 26 July 2018 (EMA / CHMP / BPWP/144533/2009 rev.2 *Committee for Medicinal Products for human use (CHMP) Guideline on the clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor VIII products.*
73. 19 November 2018 (EMA / CHMP / BPWP/144552/2009 rev.2 *Corr 1 Committee for Medicinal Products for human use (CHMP) Guideline on clinical investigation of recombinant and human plasma-derived factor IX products.*