



Rapporti ISTISAN

11/8



**Analisi del rischio di trasmissione
della malattia di Creutzfeldt-Jakob
attraverso prodotti medicinali plasmaderivati**



ISSN 1123-3117

V. Vetrugno, M. Puopolo, A. Giampaolo,
C. Chelucci, G. Zanusso

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Analisi del rischio di trasmissione
della malattia di Creutzfeldt-Jakob
attraverso prodotti medicinali plasmaderivati**

Vito Vetrugno (a), Maria Puopolo (a), Adele Giampaolo (b),
Cristiana Chelucci (b), Gianluigi Zanusso (c)

*(a) Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(c) Sezione di Neuropatologia, Dipartimento di Scienze Neurologiche,
Neuropsicologiche, Morfologiche e Motorie, Università di Verona*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

11/8

Istituto Superiore di Sanità

Analisi del rischio di trasmissione della Malattia di Creutzfeldt-Jakob attraverso prodotti medicinali plasma derivati.

Vito Vetrugno, Maria Puopolo, Adele Giampaolo, Cristiana Chelucci, Gianluigi Zanusso
2011, 28 p. Rapporti ISTISAN 11/8

La malattia di Creutzfeldt-Jakob sporadica (MCJs) è una malattia dell'uomo rara e fatale che colpisce il sistema nervoso centrale. A oggi non sono stati accertati casi di trasmissione di MCJs associati all'uso di sangue o emoderivati provenienti da donatori affetti da MCJs. Viceversa, l'agente infettivo responsabile della MCJ variante (MCJv), la forma umana della BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*), è trasmissibile attraverso il sangue. Al fine di ridurre il rischio di infezione per l'uomo sono state adottate distinte strategie precauzionali nei diversi Paesi. L'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA, *European Medicines Agency*) indica che non è necessario il ritiro dei plasmaderivati prodotti da plasma-pool contenenti donazioni di soggetti con diagnosi definita di MCJs, ne raccomanda invece il ritiro qualora fosse accertato il contributo proveniente da un soggetto riconosciuto affetto da MCJv successivamente alla donazione. In via precauzionale è auspicabile promuovere il ritiro se nel plasma-pool è identificata una donazione proveniente da un soggetto che non abbia una diagnosi definita di MCJ o che risulti affetto da MCJs atipica.

Parole chiave: Sangue; Plasma; Malattia di Creutzfeldt-Jakob; Malattie da prioni; Plasmaderivati; Analisi del rischio

Istituto Superiore di Sanità

Risk analysis of Creutzfeldt-Jakob disease transmission through plasma-derived medicinal products in humans.

Vito Vetrugno, Maria Puopolo, Adele Giampaolo, Cristiana Chelucci, Gianluigi Zanusso
2011, 28 p. Rapporti ISTISAN 11/8 (in Italian)

Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) is a rare and fatal disorder, which affects central nervous system. Up to date, no sCJD cases have been ascertained related in recipients of blood or plasma-derived medicinal products obtained from preclinical or sCJD affected donors. In contrast, BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) infectious agent, causing in humans variant CJD (vCJD), may transmit the disease through blood transfusions. To reduce the infectious risk for humans, distinct prevention strategies were introduced in different Countries. In agreement with precautionary measures issued by European Medicines Agency (EMA), when a donor post-donation is confirmed as having a definite sCJD, recall of batches of plasma-derived medicinal products is not justified. In contrast, recall is recommended in case a donor included in the plasma-pool is post-donation recognized affected by vCJD. As further precautionary measure, it is advisable to recall batches of plasma-derived medicinal products where a donor is post-donation confirmed as having atypical sCJD or CJD diagnosis is pending.

Key words: Blood; Plasma; Creutzfeldt-Jacob disease; Prion diseases; Plasma-derived medicinal products; Risk-analysis

L'Agenzia italiana del farmaco (AIFA) ha promosso questo studio nell'ambito di una convenzione con l'Istituto Superiore di Sanità.

Si ringrazia il "Registro Nazionale della MCJ e Sindromi correlate" per la preziosa collaborazione offerta.

Per informazioni su questo documento scrivere a: vito.vetrugno@iss.it.

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Per informazioni editoriali scrivere a: pubblicazioni@iss.it.

Citare questo documento come segue:

Vetrugno V, Puopolo M, Giampaolo A, Chelucci C, Zanusso G. *Analisi del rischio di trasmissione della Malattia di Creutzfeldt-Jakob attraverso prodotti medicinali plasma derivati*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/8).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.



INDICE

1. Malattie da prioni dell'uomo	1
1.1. MCJ sporadica.....	1
1.2. EST genetiche	2
1.3. MCJ iatrogena	2
1.4. MCJ variante	3
1.5. Kuru.....	4
2. Infettività del sangue e dei plasmaderivati nelle malattie umane da prioni	5
2.1. MCJ variante	5
2.2. MCJ sporadica.....	7
2.3. Altre EST	8
2.4. Evidenze sperimentali	8
3. Misure precauzionali	10
3.1. Criteri di esclusione dei donatori nell'Unione Europea.....	10
3.2. Ritiro plasmaderivati nell'Unione Europea.....	11
3.3. Stati Uniti	11
3.4. Canada.....	12
3.5. Giappone	12
3.6. Leucodeplezione.....	12
4. Plasmaderivati	14
4.1. Processo produttivo	14
4.2. Studi di validazione.....	14
5. Analisi del rischio sangue/plasma in Italia	16
5.1. MCJ variante	16
5.2. MCJ sporadica.....	17
5.3. EST genetiche	18
5.4. MCJ iatrogena	18
5.5. Azioni prospettiche da implementare in Italia.....	18
Conclusioni	19
Bibliografia	21

1. MALATTIE DA PRIONI DELL'UOMO

Le malattie da prioni o encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) sono rare e letali malattie degenerative del sistema nervoso centrale (SNC) causate da un agente infettivo (prione) apparentemente privo di acidi nucleici codificanti e resistente a procedure d'inattivazione chimico-fisiche generalmente efficaci per altri patogeni. La formazione e l'accumulo della proteina prionica patologica (PrP^{EST}), a partire dal suo precursore cellulare (PrP^C), sono gli eventi centrali nella patogenesi delle EST. Si distinguono cinque forme di EST dell'uomo: la malattia di Creutzfeldt-Jakob (MCJ) sporadica, le EST genetiche, la MCJ iatrogena, la MCJ variante e il Kuru.

1.1. MCJ sporadica

La MCJ sporadica (MCJs) comprende circa l'80% di tutti i casi di MCJ; ha un'incidenza uniforme (circa 1-2 casi per milione di abitanti per anno) nei paesi con sorveglianza epidemiologica attiva, un picco nella settima decade di vita e una durata mediana di malattia di circa 6 mesi (Pocchiari *et al.*, 2004). L'eziologia della MCJ sporadica è sconosciuta e non è legata a evidenti fattori di rischio, ad eccezione dell'omozigosi per metionina (Met/Met) al codone polimorfico 129 (codificante per metionina o valina) del gene della proteina prionica umana (*PRNP*). Circa il 70% dei pazienti con MCJ sporadica sono Met/Met contro poco meno del 40% della popolazione di controllo (Ladogana *et al.*, 2005).

La diagnosi è definita solo *post mortem* dall'analisi neuropatologica e/o dall'analisi biochimica (ricerca della PrP^{EST}) eseguita su tessuto cerebrale (Figura 1). *Intra vitam* la diagnosi è probabile se il paziente presenta una demenza e almeno due dei seguenti segni clinici: mioclono, disturbi visivi o segni cerebellari, piramidali o extrapiramidali, mutismo acinetico; associati a un tracciato elettroencefalografico (EEG) pseudo-periodico o a presenza della proteina 14-3-3 nel liquido cefalorachidiano o a un aumento di segnale bilaterale e simmetrico nei nuclei della base in risonanza magnetica (RM) cerebrale (Figura 1). La mancanza dei dati strumentali e/o la positività alla proteina 14-3-3 riducono la definizione diagnostica (MCJ sporadica possibile). A seconda del polimorfismo al codone 129 e al tipo di PrP^{EST} (tipo 1, tipo 2A o tipo misto) che si accumula nel cervello (Parchi *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1999; Cali *et al.*, 2009), la sintomatologia clinica e l'evoluzione della malattia può assumere caratteristiche alquanto diverse (Pocchiari *et al.*, 2004). Nei soggetti giovani, in particolare, la MCJ sporadica può manifestarsi con caratteristiche cliniche e strumentali simili a quelle della MCJ variante (vedi oltre), e quindi è necessario l'esame istologico e/o biochimico del cervello per distinguere le due forme di MCJ. Inoltre, in rarissimi casi, la PrP^{EST} che si riscontra nel cervello presenta caratteristiche atipiche (Zanusso *et al.*, 2007) rendendo dubbia la classificazione di questi casi.

La distribuzione dell'infettività nei tessuti e fluidi biologici nei diversi sottotipi di MCJ sporadica è stata poco indagata ma i limitati dati disponibili suggeriscono che sia costantemente presente nel SNC e, a livelli molto più bassi, anche in tessuti periferici come la milza e i linfonodi (Brown *et al.*, 1994; European Commission, 2005). Si sospetta che nella MCJ sporadica, come nella MCJ iatrogena, il coinvolgimento patogenetico dei tessuti linfoidi sia associato ai casi di relativa lunga durata di malattia clinica (vedere paragrafi 1.4 e 2.1) mentre occorra fin dal periodo preclinico nella MCJ variante (Herzog *et al.*, 2005). Tuttavia, non è possibile escludere formalmente la presenza di bassi livelli d'infettività nei tessuti periferici dei soggetti affetti da MCJ sporadica durante la fase preclinica.

Maggiori informazioni si hanno sulla distribuzione della PrP^{EST}, sebbene l'assenza di PrP^{EST} in un dato tessuto non necessariamente escluda l'infettività (Lasmezas *et al.*, 1997; Somerville *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2005; Piccardo *et al.*, 2007; Balkema-Buschmann *et al.*, 2011). Glatzel e collaboratori (Glatzel *et al.*, 2003) hanno dimostrato la presenza di PrP^{EST} in maniera variabile e irregolare in sezioni di milza e muscolo scheletrico di soggetti deceduti per MCJs. Una misura quantitativa della PrP^{EST} in questi tessuti ha rivelato un segnale 10.000 volte inferiore rispetto a quello misurato nel cervello. La presenza di PrP^{EST} nel muscolo scheletrico di soggetti deceduti per MCJ sporadica, MCJ iatrogena e MCJ variante è stata riportata successivamente da altri ricercatori (Peden *et al.*, 2006).

Nella Figura 1 sono rappresentati i criteri diagnostici della MCJ sporadica (<http://www.cjd.ed.ac.uk/criteria.htm> >ultimo accesso maggio 2011).

DEFINITA:	Conferma neuropatologica/immunocitochimica
POSSIBILE:	I + 2 del II + durata < 2 anni
PROBABILE:	Possibile + positività alla proteina 14-3-3 I + 2 del II + III o IV
<hr/>	
I =	Demenza rapidamente progressiva
II =	A Mioclono B Disturbi visivi o cerebellari C Segni Piramidali o extrapiramidali D Mutismo acinetico
III =	EEG tipico
IV =	Iperintensità ai gangli della base
<hr/>	

Figura 1. Criteri diagnostici della MCJ sporadica 2010

1.2. EST genetiche

Le forme genetiche sono circa il 10-20% delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) e comprendono la MCJ genetica (MCJg), la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) e l'Insonnia Fatale Familiare (IFF). Le EST genetiche sono associate a mutazioni del gene *PRNP* (le più frequenti sono legate alle mutazioni E200K e V210I) e si trasmettono secondo una modalità autosomica dominante. L'Italia è in Europa il secondo Paese, dopo la Slovacchia, con maggiore incidenza di forme genetiche.

Mancano dati circa la distribuzione dell'infettività o della PrP^{EST} nei tessuti e nel sangue dei soggetti affetti da forme genetiche, tuttavia si assume che il rischio infettivo rappresentato dalle forme genetiche sia simile a quello stimato per la MCJ sporadica (European Medicines Agency, 2010).

1.3. MCJ iatrogena

Le MCJ iatrogene sono secondarie all'esposizione accidentale all'agente eziologico durante procedure medico-chirurgiche (somministrazione di ormoni pituitari di origine estrattiva da ipofisi di cadavere, trapianto di *dura mater* e di cornea da donatori affetti da MCJ sporadica e, più raramente, interventi neurochirurgici con ferri non sterilizzati in maniera idonea).

L'analisi di oltre 400 casi di MCJ iatrogena descritti nel mondo ha evidenziato che il tempo di incubazione (tempo intercorrente tra l'esposizione all'agente infettivo e l'insorgenza della sintomatologia clinica) varia da un minimo di 1 a un massimo di 38 anni (Brown *et al.*, 2006).

Per le MCJ iatrogene non ci sono evidenze di una diversa distribuzione dell'infettività o della PrP^{EST} nei tessuti dei soggetti affetti rispetto alla MCJ sporadica (Brown *et al.*, 1994; Herzog *et al.*, 2005).

1.4. MCJ variante

Nel 1996 è stata descritta nel Regno Unito la forma variante della MCJ legata al consumo alimentare di prodotti carnei contaminati dall'agente infettivo responsabile dell'encefalopatia spongiforme del bovino (BSE, *Bovine Spongiform Encephalopathy*) (Will *et al.*, 1996). La MCJ variante ha un tempo d'incubazione stimato di 10-16 anni, un'età media all'esordio di 28 anni (range 12-74 anni; mediana 27 anni) e alla morte di 30 anni. La MCJ variante si distingue dalla MCJ sporadica per l'età d'esordio (di solito tra 20 e 40 anni), una maggiore durata clinica della malattia (superiore a 6 mesi) e per i sintomi di esordio rappresentati da disturbi comportamentali, modificazioni della personalità, depressione e disturbi sensoriali (Brandel *et al.*, 2009). La maggior parte dei pazienti sviluppa precocemente un'atassia cerebellare mentre, con il progredire della malattia, compaiono mioclono, coreo-atetosi e demenza. Il quadro elettroencefalografico non presenta il tipico tracciato pseudo periodico se non raramente nelle fasi terminali di malattia. La presenza di PrP^{EST} nel tessuto tonsillare, prelevato mediante biopsia, permette nella maggior parte dei casi di distinguere in vita la MCJ variante dalle altre forme di EST. Tuttavia, come per la MCJ sporadica, la diagnosi definitiva della MCJ variante viene formulata attraverso l'esame autoptico e/o biochimico (presenza di PrP^{EST} di tipo 2B) del tessuto nervoso (Parchi *et al.*, 1997), mentre la diagnosi di MCJ variante probabile si basa sulla sintomatologia clinica, sull'esame di RM cerebrale (iperintensità bilaterale del *pulvinar*) ed eventualmente sulla presenza della PrP^{EST} in campioni biotici tonsillari. I casi di MCJ variante possibili (es. per mancanza di lesioni caratteristiche alla RM cerebrale o assenza di PrP^{EST} nella tonsilla) non hanno un'adeguata accuratezza diagnostica e non sono conteggiati nelle statistiche ufficiali in Italia, come nel resto dell'Unione Europea. Questa variabilità fenotipica non permette di distinguere la MCJ variante dalla MCJ sporadica, in particolare quando quest'ultima colpisce soggetti in giovane età.

Differentemente dalle altre EST umane (Hill *et al.*, 1999; Head *et al.*, 2004) la MCJ variante è causata da un agente con uno spiccato linfotropismo (Wadsworth *et al.*, 2001, 2007; Hilton *et al.*, 2004). Il tessuto linfatico nella MCJ variante può quindi costituire un serbatoio di infettività per potenziali trasmissioni iatrogene già a partire dal periodo preclinico.

Al mese di marzo 2011 sono stati riportati 224 casi di MCJ variante di cui 175 nel Regno Unito (per il numero aggiornato di casi nel Regno Unito e nel resto del mondo si può consultare il sito <http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm> ultima consultazione 19/05/2011). Nel Regno Unito il picco di mortalità è stato raggiunto nel 2000, con 28 decessi, e da allora è andato a diminuire fino a registrare solo 1-2 casi per anno nel periodo 2007-2009. A oggi, tutti i casi clinici di MCJ variante certi e probabili sono risultati omozigoti per metionina (M/M) al codone polimorfico 129 del gene

PRNP, indicando quindi questo tipo di omozigosi come un potente fattore di suscettibilità. Tuttavia, recentemente, è stato descritto un caso classificato come “MCJ variante possibile” in un soggetto con genotipo Met/Val (Kaski *et al.*, 2009).

In Francia, Paese col più alto numero di casi di MCJ variante (n. 25) dopo il Regno Unito, l'epidemia ha mostrato un andamento simile a quello britannico ma il maggior numero di decessi si è osservato nel periodo 2004-2005. Il ritardo di 5 anni nel picco dell'epidemia è probabilmente dovuto alla ritardata esposizione della popolazione francese alla BSE importata dal Regno Unito (Flan *et al.*, 2007; Zou *et al.*, 2009). L'età media è di 36 anni all'esordio (range, 18-57 anni; mediana, 35 anni) e 37 alla morte (Brandel *et al.*, 2009). La stima del numero totale di MCJ variante in Francia è di 33 casi di cui i due terzi nella popolazione nata dopo il 1969 e il restante terzo tra quelli nati tra il 1940 e il 1969 (Chadeau-Hyam *et al.*, 2005).

In Italia sono stati descritti due casi di MCJ variante, entrambi Met/Met al codone 129, in soggetti che non hanno soggiornato in UK e non hanno donato né ricevuto trasfusioni di sangue (La Bella *et al.*, 2002; <<http://www.iss.it/rncj>>).

Due studi retrospettivi hanno cercato di fornire stime più precise della prevalenza d'infezione della MCJ variante nel Regno Unito. Il primo studio è stato condotto su campioni di tonsille e appendici rimosse chirurgicamente negli anni 1996-1999 da soggetti in prevalenza di 20-29 anni (Hilton *et al.*, 2004). Su un totale di 11.247 appendici analizzate, 3 sono risultate PrP^{EST} positive in immunoistochimica. Nei soggetti della coorte di nascita 1961-85 la prevalenza stimata di 292 casi subclinici per milione (95% IC: 60-853) fa prevedere, nella popolazione generale del Regno Unito, un numero di casi compreso tra 520 e 13.000 (Clewley *et al.*, 2009). Due delle appendici rinvenute positive per la PrP^{EST} appartenevano a individui omozigoti per valina al codone 129, suggerendo una potenziale suscettibilità all'infezione anche dei soggetti Met/Val e Val/Val al codone 129 del *PRNP* (Ironsides *et al.*, 2006). Questa possibilità è stata confermata sperimentalmente in topi transgenici umanizzati infettati con la MCJ variante (Hill *et al.*, 2000; Race *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2006). Il secondo studio eseguito su campioni di tonsille (NATA, *National Anonymous Tonsil Archive*) è stato iniziato nel 2003 e sarà completato nel 2013 (Clewley *et al.*, 2009). Alla fine del 2008, su più di 63.000 coppie di tonsille analizzate – oltre 12.000 delle quali provenienti da soggetti nella coorte di nascita 1961-85, nella quale sono stati riportati più dell'80% dei casi di MCJ variante – non è stata rilevata alcuna reattività per la PrP^{EST}, stimando una prevalenza di zero casi subclinici/preclinici per milione di abitanti (95% IC: 0-289) (Clewley *et al.*, 2009). Sebbene questa seconda stima sia più bassa di quella riportata nell'analogo studio di Hilton sulle appendici, risulta ancora compatibile con la prima (P=0.09, mettendo a confronto le stime di prevalenza calcolate nei due studi). Inoltre, i due studi presentano differenze nelle popolazioni in studio e nel tipo di test di screening eseguito (Clewley *et al.*, 2009).

In Italia, così come in altri Paesi con bassa incidenza di casi di MCJ variante, gli studi di prevalenza su campioni di tonsille e/o appendici non sarebbero in grado di dare alcuna risposta e sono pertanto sconsigliati (Pocchiari *et al.*, 2009).

1.5. Kuru

Il Kuru è una EST pressoché estinta che intorno alla metà del secolo scorso si manifestava in forma epidemica tra gli indigeni di lingua Fore della Papua-Nuova Guinea, dediti a pratiche rituali endocannibaliche, praticate in prevalenza da donne e bambini. L'origine del Kuru è sconosciuta ma è verosimile che sia comparsa tra la popolazione Fore all'inizio del XX secolo, probabilmente in seguito alla comparsa di un caso di MCJ sporadica (Wadsworth *et al.*, 2008). Un lungo studio osservazionale ha riportato che il tempo d'incubazione del Kuru poteva superare i 50 anni nei soggetti eterozigoti al codone 129 del *PRNP* (Collinge *et al.*, 2006).

2. INFETTIVITÀ DEL SANGUE E DEI PLASMADERIVATI NELLE MALATTIE UMANE DA PRIONI

2.1. MCJ variante

Nel 1997 venne avviato nel Regno Unito lo studio collaborativo denominato “TMER” (*Transfusion Medicine Epidemiological Review*) tra la *National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit* (NCJDSU) e la *UK Blood Services* (UKBS) al fine di identificare eventuali trasmissioni di MCJ variante legate al sangue. Nel 2004 venne identificato il primo caso di MCJ variante secondaria associata a una trasfusione di sangue (es. eritrociti concentrati non leucodepleti) ricevuta sei anni e mezzo prima. Il donatore, tre anni e mezzo dopo la donazione, aveva sviluppato i sintomi della MCJ variante (Llewelyn *et al.*, 2004). Successivamente, altri due casi clinici di MCJ variante sono stati attribuiti a trasfusioni di sangue. Analogamente al primo caso, anche questi soggetti erano stati trasfusi con rossi concentrati non leucodepleti. In tutti e tre i casi descritti le donazioni di sangue responsabili dell’infezione provenivano da soggetti clinicamente in buona salute al momento della donazione ma che successivamente (es. 17-40 mesi più tardi), avevano sviluppato la MCJ variante. Inoltre, i soggetti riceventi, omozigoti per metionina (Met/Met) al codone 129 del gene PRNP, avevano sviluppato la MCJ variante da 6,5 a 8,5 anni dopo le trasfusioni. Le caratteristiche cliniche e neuropatologiche riportate in questi soggetti erano analoghe a quelle riscontrate nei casi di MCJ variante attribuiti alla BSE acquisita per via orale.

Un quarto probabile caso di MCJ variante legato al sangue è quello di un soggetto asintomatico, eterozigote (Met/Val) al codone 129 del gene PRNP, deceduto per una malattia non neurologica 5 anni dopo aver ricevuto una trasfusione da un donatore che in epoca successiva alla donazione era stato scoperto affetto da MCJ variante e risultato positivo per la PrP^{EST} nella milza e nel linfonodo cervicale (infezione preclinica o subclinica) (Peden *et al.*, 2004). Tutti assieme questi casi forniscono forte evidenza circa la trasmissibilità della MCJ variante attraverso il sangue.

Al dicembre 2009 nel Regno Unito sono stati identificati 29 soggetti che hanno donato sangue prima dell’esordio clinico della MCJ variante:

- 18 soggetti hanno donato sangue e i componenti labili (globuli rossi, piastrine, plasma fresco congelato) sono stati somministrati a 66 riceventi (Gillies *et al.*, 2009):
 - 22 sono ancora in vita.
 - 44 sono deceduti (a questi appartengono i 4 casi sopra descritti). Le informazioni cliniche sono state ottenute solo per 33 soggetti, 9 dei quali avevano riportato sintomi neurologici. Per due di questi pazienti è stato possibile escludere la diagnosi di MCJ variante in seguito ad accertamento autoptico.
- 11 soggetti hanno donato plasma, confluito in 25 pool, destinato alla produzione di plasmaderivati prima del 1999, anno in cui è stato vietato l’utilizzo di plasma britannico in favore di quello importato dagli Stati Uniti (www.cjd.ed.ac.uk/TMER/summary.htm ultima consultazione 19/05/2011).

Recentemente sono stati descritti altri due casi di possibile trasmissione di MCJ variante tramite trasfusione di sangue, associati a un potenziale donatore comune, in vita dopo 20 anni dalle donazioni implicate. Uno dei due casi, deceduto per MCJ variante all’età di 18 anni era

stato trasfuso ripetutamente (es. con rossi concentrati) nei suoi primi due mesi di vita perché nato pretermine (Chohan *et al.*, 2010).

Nel 2008, in un paziente settantenne affetto da emofilia A, deceduto per cause non neurologiche, la ricerca biochimica della PrP^{EST} ha evidenziato una positività in un campione autoptico di milza (su 23 diversi prelievi analizzati); tutti gli altri organi e tessuti indagati (es. cervello, cuore, fegato, appendice, linfonodi, tonsille) sono risultati negativi (Peden *et al.*, 2010). Questo soggetto, Met/Val al codone 129 del gene *PRNP*, aveva ricevuto negli anni '90 fattore VIII proveniente da numerosi lotti prodotti a partire da plasma frazionato nel Regno Unito, tra cui, in particolare, 11 anni prima, da due lotti distinti (*implicated batches*) contenenti il plasma donato da un soggetto deceduto per MCJ variante quattro anni e mezzo anni dopo la donazione (Peden *et al.*, 2010).

In considerazione dell'alto numero di lotti di plasmaderivati utilizzati nel trattamento di un emofilico e della stima di prevalenza della MCJ variante in UK è stato ritenuto più probabile che il paziente emofilico abbia contratto l'infezione tramite i lotti di plasmaderivati prodotti in UK "non implicati" (nei quali non sono confluite donazioni di soggetti scoperti affetti da MCJ variante) (Bennet & Ball, 2009).

Tra il 1980 e il 2000 circa 6.000 pazienti, principalmente affetti da emofilia A e B, sono stati trattati nel Regno Unito con fattori della coagulazione concentrati prodotti a partire da plasma di provenienza britannica. Il Regno Unito fino al 1998 ha frazionato plasma nazionale e quindi a rischio di contaminazione con l'agente infettivo responsabile della MCJ variante. A oggi, sono stati tracciati 174 lotti di plasma provenienti da pool potenzialmente infetti (Hewitt *et al.*, 2006). È stato riportato che almeno 200 pazienti emofilici abbiano ricevuto trattamenti terapeutici con fattori della coagulazione prodotti con plasma ottenuto da almeno un donatore con diagnosi confermata di MCJ variante. Ma questo numero è ritenuto verosimilmente una sottostima.

Nel Regno Unito sono stati identificati sette pazienti affetti da MCJ variante che tra il 1989 e il 1998 avevano ricevuto somministrazioni occasionali di immunoglobuline (IG) provenienti da lotti non implicati o non identificati, ma questi casi non sono stati ritenuti imputabili all'uso di IG (Ward *et al.*, 2009). Inoltre, nel 2009 è stato riportato il caso di una paziente, deceduta all'età di 72 anni per tumore intestinale, che aveva ricevuto nove anni prima ripetute somministrazioni di IG endovena (IVIG) da lotti prodotti da plasma-pool contenenti la donazione di un soggetto che successivamente aveva sviluppato la MCJ variante. L'esame neuro-isto-patologico è risultato negativo così come la ricerca mediante Western blot della PrP^{EST} nel cervello, nella milza e nei linfonodi della paziente (El-Shanawany *et al.*, 2009). Tuttavia, non è possibile escludere che in futuro e con tempi d'incubazione molto lunghi, casi di MCJ variante associati a trattamenti prolungati con IVIG possano manifestarsi nella popolazione esposta (Ward *et al.*, 2009).

In Francia sono stati identificati tre pazienti con diagnosi di MCJ variante che avevano donato sangue e plasma prima dell'esordio clinico tra il 1991 e il 2004. Nel 2008, tra i 42 riceventi gli emocomponenti (eritrociti e piastrine, leucodepleti e non), 14 pazienti ancora in vita sono stati rintracciati e informati, in via cautelativa e per ragioni di sanità pubblica, del rischio potenziale di essere stati esposti alla MCJ variante. Inoltre, due dei tre pazienti avevano anche donato plasma destinato al frazionamento, 10 volte in un caso e 12 nell'altro (Lefrere & Hewitt, 2009). È stato stimato che i prodotti del frazionamento, derivati dai plasma-pool nei quali sono confluite queste donazioni potenzialmente infette, sono stati somministrati a circa 50.000 pazienti: 2.000 dei quali trattati per disturbi cronici come le coagulopatie e le immunodeficienze, i restanti per trattamenti occasionali (es. con albumina e IG). È stato accertato che un numero significativo di pazienti ha ricevuto trattamenti terapeutici con fattori della coagulazione prodotti da plasma-pool contenenti donazioni di soggetti con diagnosi confermata di MCJ variante (Lefrere & Hewitt, 2009).

2.2. MCJ sporadica

La descrizione di singoli casi di possibili trasmissioni di MCJ sporadica tramite sangue ed emoderivati sono aneddotici dato il breve intervallo di tempo riportato tra l'esposizione e lo sviluppo della malattia (Klein *et al.*, 1993; Creange *et al.*, 1995; Collins *et al.*, 1999; Ricketts *et al.*, 1997).

In Italia è stato condotto uno studio osservazionale sul rischio legato alle trasfusioni di sangue, mettendo a confronto soggetti con MCJ sporadica (probabile o definita) con pazienti "non-MCJ" segnalati al registro ma nei quali la diagnosi di MCJ sporadica era stata esclusa, clinicamente o patologicamente (Puopolo *et al.*, 2011). Il 4,7% dei casi di MCJ sporadica riportavano una trasfusione di sangue ricevuta almeno 10 anni prima dell'esordio della malattia rispetto all'1,9% dei soggetti non-MCJ, con un *crude odd ratio* (IC 95%) di 2,61 (1,21-6,22), suggerendo un possibile rischio associato alla trasfusione. L'analisi multivariata, condotta per tener conto del ruolo di fattori di rischio noti (polimorfismo al codone 129, età all'esordio, neurochirurgia o trapianto di cornea e interventi chirurgici) e di possibili fattori di confondimento o *bias* (anno di esordio, paziente visitato da un neurologo del registro Nazionale della MCJ), ha confermato un rischio associato alla trasfusione di sangue ricevuta almeno 10 anni prima dell'esordio clinico della malattia [*adjusted odd ratio* (IC 95%): 5,05 (1,37-18,63)] (Puopolo *et al.*, 2011).

Rimane discutibile se la significatività statistica di questo risultato sia biologicamente plausibile o soltanto la conseguenza dei limiti del disegno dello studio. Questo risultato è in contrasto con i risultati di numerosi studi condotti in altri Paesi (Kondo *et al.*, 1982; Esmonde *et al.*, 1993; van Duijn *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 1999; Wientjens *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2000; Hamaguchi *et al.*, 2009; Ward *et al.*, 2008; Ruegger *et al.*, 2009) da cui non è emerso un rischio maggiore di sviluppare la MCJ sporadica in pazienti emotrasfusi. A differenza dello studio italiano la maggior parte degli studi condotti negli altri Paesi non ha preso in considerazione tempi di incubazione superiori ai 10 anni. Pertanto, non è possibile escludere che i limiti metodologici legati alla scelta dei controlli e alle modalità di raccolta dei dati (es. questionari, interviste telefoniche), che sono risultati determinanti nella valutazione del rischio associato agli interventi chirurgici (Barash *et al.*, 2008), possano aver condizionato anche la valutazione del rischio associato alle trasfusioni di sangue condotta con gli studi caso-controllo.

Due studi retrospettivi (*look-back*) sui riceventi emoderivati donati da pazienti deceduti per MCJ sporadica non hanno messo in evidenza alcun nesso causale (Operskalki *et al.*, 1995; Heye *et al.*, 1994). In particolare nello studio di Heye e collaboratori (Heye *et al.*, 1994) è stato riportato il caso di un donatore deceduto per MCJ sporadica che aveva donato sangue a 35 pazienti dei quali 21 erano deceduti dopo un tempo post-trasfusione inferiore o uguale a 22 anni e con una diagnosi clinica che escludeva demenza o altre malattie neurologiche e i rimanenti 14 soggetti erano ancora in vita dopo 14 anni. Analogamente, gli studi di *look-back* in corso nel Regno Unito (Hewitt *et al.*, 2006) e negli Stati Uniti (Dorsey *et al.*, 2009) non hanno evidenziato l'esistenza di un rischio di contrarre la MCJ sporadica in seguito a trasfusione di sangue. Sebbene la potenza statistica di questi studi non sia ancora molto elevata, questi studi hanno messo in evidenza una netta differenza nel rischio di trasmissione mediante sangue tra MCJ sporadica e MCJ variante (test esatto di Fisher, $p=0,012$) (Dorsey *et al.*, 2009). Da quest'ultimo studio si stima che l'efficienza di trasmissione della malattia è inferiore al 2,53% (con 0 casi osservati in 144 riceventi) a 5 anni post-trasfusione ed è inferiore al 4,51% (con 0 casi osservati su 80 riceventi) a 11 anni.

In Italia non sono stati ancora condotti studi di *look-back* per analizzare eventuali associazioni tra donatori e/o riceventi sangue che hanno sviluppato la MCJs.

Inoltre, due studi neuropatologici eseguiti negli Stati Uniti (n. 24) e nel Regno Unito (n. 33), su pazienti che avevano fatto uso intensivo di plasmaderivati non hanno evidenziato segni di malattia (Evatt *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1998).

2.3. Altre EST

Non esistono dati consistenti sulla possibile presenza o assenza di infettività nel sangue della MCJ iatrogena e delle EST genetiche. Ai fini della valutazione del rischio dei plasmaderivati si ipotizza che queste forme si comportino come la MCJ sporadica (vedi paragrafi 1.2 e 1.3).

2.4. Evidenze sperimentali

Nella pecora, sia la BSE sperimentale (Houston *et al.*, 2000) che la scrapie naturale (Hunter *et al.*, 2002) sono state trasmesse con successo a pecore sane sia mediante trasfusioni di sangue intero (400-450 mL = 1 unità) che con preparazioni di *buffy coat* (frazione contenente i leucociti, ottenuta mediante centrifugazione del sangue intero non coagulato). La trasmissione è anche avvenuta con campioni prelevati nel periodo pre-clinico (Houston *et al.*, 2008).

Anche il *buffy coat* ottenuto da primati (*Microcebus*) infettati sperimentalmente con l'agente della BSE ha trasmesso la malattia per via intracerebrale con tempi d'incubazione sovrapponibili a quelli riscontrati negli animali inoculati con tessuto nervoso (Bons *et al.*, 2002).

Bassi livelli di infettività (1-10 dosi infettive per millilitro di sangue intero) sono stati inoltre misurati nel sangue di roditori sperimentalmente infettati con ceppi di prioni animali e umani sia durante la fase clinica che preclinica di malattia (Casaccia *et al.*, 1989; Brown, 1995; Brown *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1999; Holada *et al.*, 2002; Cervenakova *et al.*, 2003; DNV, 2003; Gregori *et al.*, 2006; Brown, 2007). Da studi su modelli sperimentali si è stimato che l'infettività presente nel plasma sia circa il 50% di quella presente nel sangue intero (Gregori *et al.*, 2004; Vamvakas, 2011).

Nelle EST dell'uomo i dati sperimentali per valutare la presenza di infettività nel sangue sono molto scarsi, effettuati su un numero molto limitato di campioni, utilizzando pochi animali nel saggio biologico e pertanto di limitata utilità per dimostrare la presenza o l'assenza di infettività.

Sono disponibili i seguenti studi:

- i. MCJ variante
 - *Buffy coat* e plasma provenienti da 4 pazienti clinicamente affetti da MCJ variante, inoculati per via intracerebrale in topi *wild-type*, non hanno trasmesso la malattia (Bruce *et al.*, 2001).
- ii. MCJs
 - Scimpanzé inoculati per via intracerebrale con sangue proveniente da pazienti affetti con MCJ sporadica non hanno sviluppato segni di malattia (Gajdusek & Gibbs, 1971).
 - Sangue intero (più di 300 mL) proveniente da tre differenti pazienti affetti da MCJ sporadica trasfuso in tre scimpanzé non ha trasmesso la malattia dopo un periodo di osservazione di oltre 20 anni (Asher *et al.*, 1976; Brown *et al.*, 1994).

- *Buffy coat* da un paziente affetto da MCJ sporadica inoculato contemporaneamente per via intracerebrale e intraperitoneale in 4 primati non ha trasmesso la malattia (Brown *et al.*, 1994).
- Sangue intero proveniente da un paziente (Tateishi, 1985), *buffy coat* da due pazienti (Manuelidis *et al.*, 1985), e plasma (concentrato) da un paziente (Tamai *et al.*, 1992) con MCJ sporadica hanno trasmesso la malattia in roditori dopo inoculazione intracerebrale. Tuttavia questi risultati non sono stati confermati in altri studi (Brown, 1995).

iii. MCJ iatrogena

- *Buffy coat* da un paziente con MCJ iatrogena acquisita in seguito a terapia con ormone della crescita ha trasmesso la malattia dopo inoculazione per via intracerebrale in un singolo criceto (Deslys *et al.*, 1994).

Le sperimentazioni nei primati e nelle pecore hanno evidenziato che il fenotipo clinico-patologico rimane costante usando diverse vie di inoculazione (intracerebrale, orale, endovenosa) e che la via endovenosa presenta un'alta efficienza di trasmissione (Herzog *et al.*, 2004; Lazmesas *et al.*, 2001; Sisò *et al.*, 2006). Inoltre, è stato anche dimostrato che i fenotipi patologici della BSE in pecora, dopo infezione per via orale con omogenato cerebrale o in seguito a trasfusione di sangue, sono praticamente indistinguibili. Questi risultati suggeriscono che anche per la MCJ variante, trasmessa all'uomo tramite sangue, ipotetici cambiamenti nel fenotipo clinico e molecolare risultino alquanto improbabili (Wroe *et al.*, 2006; Bishop *et al.*, 2008; Ritchie *et al.*, 2009).

3. MISURE PRECAUZIONALI

Non essendo a oggi disponibile un test di screening per i prioni sul sangue, l'implementazione di misure precauzionali ha riguardato la revisione dei criteri di eleggibilità dei donatori di sangue/plasma, l'adozione della pratica della leucodeplezione e l'introduzione nel processo produttivo dei plasmaderivati di procedure *ad hoc* per la rimozione/inattivazione dei prioni. Tali strategie, messe in atto con modalità diverse nei vari Paesi, hanno rappresentato la prima linea di difesa per contrastare il rischio di una potenziale diffusione epidemica della MCJ variante attraverso il sangue/plasma (Seitz *et al.*, 2007).

3.1. Criteri di esclusione dei donatori nell'Unione Europea

I criteri di selezione dei donatori prevedono di escludere dalla donazione i soggetti riconosciuti con un più alto rischio di sviluppare la MCJ. La direttiva Comunitaria 2004/33/EC, che ha implementato la 2002/98/EC, ha specificato il divieto permanente di donazione per i soggetti:

- i. con antecedenti medici o familiari che comportano un rischio di sviluppare le EST;
- ii. che hanno ricevuto un trapianto di cornea o dura madre o che in passato sono stati trattati con medicinali estratti da ghiandole pituitarie umane;
- iii. che hanno ricevuto trasfusioni allogeneiche;

e, specificatamente per la MCJ variante, ha previsto misure aggiuntive come il criterio di esclusione geografico, basato sul periodo cumulativo trascorso nel Regno Unito:

- iv. divieto permanente di donazione per i soggetti che hanno soggiornato nel Regno Unito per un periodo cumulativo uguale o superiore a un anno, nel periodo compreso tra il 1980 e il 1996; questo limite temporale poteva essere ridotto a periodi inferiori (es. ≥ 6 mesi come adottato in Italia) sulla scorta di un bilancio del rischio/beneficio, su base nazionale, bilanciando il rischio stimato di esposizione per via alimentare della popolazione alla BSE con il rischio potenziale di depauperare le scorte di sangue e plasma per le trasfusioni e la manifattura di prodotti emoderivati (European Medicines Agency, 2003).

Nel Regno Unito dal 1998 è stato vietato l'uso del plasma nazionale, in favore di quello importato dagli Stati Uniti. Coerentemente, nel resto d'Europa sono stati esclusi dalla donazione di sangue e plasma i soggetti che avevano soggiornato nel Regno Unito per tempi cumulativi uguali o superiori a un anno nel periodo compreso tra il 1996 e il 2000 (anni a maggior rischio di potenziale contagio per via alimentare con la BSE). In Italia è stato adottato il limite più restrittivo di sei mesi.

Le autorità sanitarie europee non raccomandano l'esclusione dei donatori che hanno soggiornato in Francia (o in altri Paesi con rischio MCJ variante pari o inferiore alla Francia) per periodi cumulativi analoghi o superiori in quanto il rischio stimato è significativamente più basso rispetto a quello attribuito alla residenza nel Regno Unito (il rischio in Francia viene stimato pari a 1/10 di quello del Regno Unito) (European Medicines Agency, 2010).

Inoltre in Francia esiste il divieto di donazione di sangue e plasma per coloro i quali abbiano ricevuto a loro volta trasfusioni o hanno fatto uso di plasmaderivati.

In Francia è permesso l'utilizzo del plasma autoctono per il frazionamento.

3.2. Ritiro plasmaderivati nell'Unione Europea

L'Agenzia Europea dei Medicinali (EMA) ha raccomandato il ritiro dal mercato dei plasmaderivati se nel plasma-pool, da cui sono stati ricavati, è inclusa la donazione di un soggetto scoperto affetto da MCJ variante.

Viceversa, l'EMA ha ribadito che il ritiro dei prodotti plasmaderivati non è giustificato ove si scoprisse successivamente il donatore affetto da MCJ sporadica, genetica o iatrogena (European Medicines Agency, 2010). La Francia, che ha il più alto numero di casi di MCJ variante dopo il Regno Unito, ha adottato per legge, dal dicembre 2000, la misura precauzionale di ritirare dal mercato i plasmaderivati qualora si scoprisse che sono stati prodotti con plasma donato da soggetti affetti o a rischio per qualunque forma di MCJ (AFSSAPS, 2004).

In Italia, sebbene in assenza di una normativa specifica, i lotti di plasmaderivati in cui sono confluite le donazioni da parte di soggetti diagnosticati affetti da MCJ sporadica sono di prassi ritirati dal commercio per motivi esclusivamente precauzionali.

3.3. Stati Uniti

Nel 1996, la *Food and Drug Administration* (FDA), l'ente regolatorio americano, nel documento dal titolo *Revised precautionary measures to reduce the possible risk of transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) by blood and blood products* aveva stabilito come misura preventiva la quarantena e la distruzione del sangue, dei suoi componenti e dei plasmaderivati provenienti da donatori ritenuti a rischio di sviluppare la MCJ (sporadica, genetica, iatrogena) o che successivamente alla donazione fossero stati diagnosticati affetti da MCJ. Inoltre introduceva per i soggetti ritenuti a rischio di MCJ il divieto permanente di donare sangue e plasma (Menache *et al.*, 1996).

Tuttavia, l'introduzione di queste drastiche misure determinò da subito gravi carenze di prodotto per i pazienti (Ludlam e Turner, 2006; WHO, 2003); ed è per questo motivo che l'FDA dal 1999 dispose che fossero ritirati dal commercio esclusivamente i plasmaderivati contenenti plasma proveniente da donatori scoperti affetti da MCJ variante o con sospetto clinico di MCJ variante.

Negli Stati Uniti non potevano donare sangue e plasma i soggetti: a) che avevano soggiornato nel Regno Unito per un tempo cumulativo di 6 mesi (nel 2002 questo periodo è stato ulteriormente ridotto a 3 mesi); b) che avevano soggiornato in Francia o in un'altra nazione europea classificata a rischio per la BSE per un periodo cumulativo uguale o superiore ai cinque anni, c) che avessero utilizzato insulina prodotta da bovini originari del Regno Unito.

Nel 2006, venne inoltre vietata la donazione di sangue (ma non di plasma) a coloro i quali avessero avuto una storia clinica di trasfusioni di sangue nel Regno Unito dal 1980 in poi (FDA, 2002; FDA, 2006). Più recentemente, questo divieto è stato esteso anche a chi avesse ricevuto trasfusioni in Francia.

È stato stimato che queste misure, che comportavano l'esclusione del 7% della popolazione idonea a donare il sangue negli Stati Uniti, siano state in grado di ridurre il rischio potenziale di contrarre la MCJ variante di oltre il 90%.

3.4. Canada

In Canada sono esclusi dalla donazione di sangue o plasma coloro che hanno soggiornato per un periodo cumulativo di tre mesi o più nel Regno Unito o in Francia tra il 1980 e il 1996 o che hanno trascorso un periodo cumulativo di 5 o più anni nel resto dell'Europa occidentale (Germania, Italia, Olanda, Svizzera, Austria, Belgio, Spagna, Irlanda, Portogallo, Danimarca, Lussemburgo, Liechtenstein) sempre nello stesso periodo.

Inoltre, vengono esclusi i soggetti che hanno ricevuto una trasfusione di sangue o un trattamento medico con un emoderivato nel Regno Unito, in Francia o nel resto dell'Europa occidentale (Canadian Blood Service, 2009).

Quest'ultima azione è stata introdotta in seguito all'identificazione di circa 70 pazienti che erano stati trattati nel Paese, dal 1992 alla prima metà del 1998, con Fattore XI importato dal Regno Unito o dalla Francia. Questi pazienti hanno ricevuto comunicazione formale dalle autorità sanitarie locali canadesi circa la loro potenziale esposizione alla MCJ variante.

A partire dal secondo semestre del 1998, il fattore XI e gli altri fattori della coagulazione concentrati, le IG e l'albumina sono prodotti esclusivamente con plasma collezionato in Canada o negli Stati Uniti (Paesi dove non sono stati riportati casi nativi di MCJ variante).

In Canada non è previsto il ritiro dei plasmaderivati prodotti da plasma-pool qualora in essi siano confluite unità provenienti da pazienti affetti da MCJ sporadica.

3.5. Giappone

In Giappone non possono donare sangue coloro i quali hanno soggiornato nel Regno Unito o in Francia tra il 1980 e il 1996 anche per un solo giorno o tra il 1997 e il 2004 per 6 mesi cumulativi.

A oggi è stato riportato un solo caso di MCJ variante in un soggetto che aveva soggiornato nel Regno Unito nel 1990 per meno di un mese.

In Giappone non è previsto il ritiro dei plasmaderivati prodotti da plasma-pool nei quali siano confluite donazioni provenienti da pazienti affetti da MCJ sporadica.

3.6. Leucodeplezione

Il processo di leucodeplezione o leucoriduzione è comunemente usato in medicina trasfusionale per ridurre il livello di cellule bianche nel sangue e nei suoi componenti.

Nel 1999, nel Regno Unito, è stata adottata a fini precauzionali la leucodeplezione obbligatoria del sangue intero donato. Il rationale di utilizzo della leucodeplezione come misura precauzionale derivava dal riconosciuto coinvolgimento patogenetico del sistema linforeticolare nella MCJ variante e dall'aver misurato bassi livelli di infettività nel *buffy coat* di roditori sperimentalmente infettati (Vamvakas, 2011).

È stato stimato che la leucodeplezione sia in grado di rimuovere circa il 50% dell'infettività prionica, quella associata appunto ai globuli bianchi (Brown, 2000; Gregori *et al.*, 2004; Gregori *et al.*, 2006; Burnouf & Padilla, 2006).

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 (n. max leucociti residui $<10^6/L$) (Flan *et al.*, 2007).

In Italia, la leucodeplezione viene eseguita su circa il 30% delle emazie concentrate e sul 55% delle piastrine ma non sul plasma (European Directorate for the Quality of Medicines, 2006).

A oggi, l'EMA non ha raccomandato l'adozione obbligatoria della leucoriduzione sul plasma destinato al frazionamento (European Medicines Agency, 2010).

Altri Paesi come gli Stati Uniti e l'Australia adottano una politica di leucodeplezione selettiva degli emocomponenti.

4. PLASMADERIVATI

4.1. Processo produttivo

In relazione al rischio di trasmettere la MCJ variante all'uomo, i plasmaderivati sono stati classificati dalle autorità sanitarie inglesi, in tre gruppi: **alto rischio** (es. una singola dose di FVIII o FIX o antitrombina somministrata endovena è ritenuta sufficiente a trasmettere la malattia), **medio rischio** (es. IG iniettabili endovena, IGIV; larghe dosi di albumina 4,5%) e **basso rischio** (es. IG iniettabili intramuscolo, IGIM, e albumina 20%⁽¹⁾). Questa classificazione esprime una stima teorica della dose di plasma derivato necessaria per incrementare dell'1% il rischio individuale di un paziente di essere esposto all'agente infettivo responsabile della MCJ variante rispetto a quello acquisito con la dieta. Nel Regno Unito, una soglia teorica d'esposizione alla MCJ variante, superiore all'1% (0,01 UI)⁽²⁾ in aggiunta al rischio di base stimato nella popolazione generale e acquisito tramite il consumo nel passato di prodotti alimentari contaminati con l'agente infettivo della BSE, comporta la notifica obbligatoria di soggetto a rischio "per ragioni di sanità pubblica" (CJD Incidents Panel, 2004; Turner & Ludlam, 2009; Ward *et al.*, 2009).

Gli studi di validazione a oggi pubblicati hanno stimato che il processo di produzione delle IG riesce a rimuovere circa 5 log di infettività (Thyer *et al.*, 2006; Reichl *et al.*, 2002). Le IG sono quindi in una fascia di rischio più bassa rispetto ai fattori della coagulazione. In considerazione della via di somministrazione e della frequenza del trattamento terapeutico, le IG sono state inoltre classificate in prodotti a medio (IGIV) o basso rischio (IGIM).

Nella valutazione del rischio sull'uso dei plasmaderivati, oltre alla pericolosità specifica associata alla tipologia di prodotto, occorre anche distinguere il trattamento terapeutico occasionale (es. IGIM per immunoprofilassi passiva, infusioni di albumina) da quello intensivo e periodico (es. fattori della coagulazione per la cura delle coagulopatie, IGIV nelle immunodeficienze primarie). Inoltre, non è possibile escludere che singole e sub-infettive dosi di prioni somministrate per via periferica, se ripetute nel tempo, possano cumularsi e risultare quindi efficienti nel trasmettere le EST (Jacquemot *et al.*, 2005).

4.2. Studi di validazione

Tutti i produttori di plasmaderivati sono tenuti a produrre una valutazione del rischio teorico di contaminazione da prioni per i loro prodotti (European Medicines Agency, 2004). Tali

⁽¹⁾ Il rischio per l'albumina umana comunemente utilizzata come stabilizzante nei prodotti vaccinali umani in piccole quantità è stimato molto basso.

⁽²⁾ Una unità infettiva o dose infettiva (UI) è per definizione il quantitativo minimo d'infettività che ha il 100% di probabilità di infettare un ricevente (Brown, 2001; DNV, 2003). La dose infettiva 50 (DI₅₀) è definita invece come la dose in grado di causare l'infezione nel 50% della popolazione esposta. La stima sperimentale delle DI₅₀ richiedendo la misura dei tassi d'infezione in una serie di diluizioni, necessita di un numero molto grande di animali da laboratorio, particolarmente se il livello dell'infettività da misurare è basso. Sebbene non sia possibile un'esatta conversione tra le due, in prima approssimazione e per lo sviluppo di calcoli teorici, si può assumere che 1 UI=2 DI₅₀. Dato che il rischio per il sangue e i plasmaderivati per l'uomo è essenzialmente tramite un'esposizione per via endovenosa (ev), l'infettività è espressa in DI₅₀/mL (ev) o UI/mL (ev).

valutazioni devono includere anche stime quantitative della potenziale infettività prionica presente in una dose definita di prodotto.

Gli studi di validazione, eseguiti sui plasmaderivati o sul sangue, stimano la capacità di un dato processo produttivo (che si compone di vari *step*) di inattivare/rimuovere frazioni significative di infettività prionica. Questi studi prevedono l'utilizzo di uno *spike* (un materiale infettivo con cui si contamina sperimentalmente la matrice in esame), di solito costituito da materiale cerebrale proveniente da roditori sperimentalmente infettati con ceppi di EST (*spike* esogeno). In alcuni studi di validazione è stato utilizzato anche il sangue infetto prelevato da roditori o piccoli ruminanti sperimentalmente infettati con vari ceppi di EST (*spike* endogeno).

Gli studi di validazione quantificano un fattore di riduzione teorico per l'intera procedura o, più frequentemente, per singoli passaggi dei processi produttivi (es. precipitazione, estrazione con solvente/detergente, cromatografia, nanofiltrazione) (Foster *et al.*, 2004; Gregori *et al.*, 2006; Burnouf & Padilla, 2006; Brown, 2007).

Purtroppo i diversi studi di validazione non sono agevolmente comparabili tra loro in quanto il processo produttivo adottato per la produzione di plasmaderivati analoghi può differire in impianti di plasma-frazionamento appartenenti a ditte diverse.

Inoltre, ciascun plasma-frazionatore può decidere di validare la procedura in modo autonomo utilizzando ceppi differenti di EST, *spike* differenti (endogeno o esogeno), diverse modalità preparatorie dello *spike* (preparato crudo o purificato) e per ultimo, ma non meno importante, preferire il saggio biochimico di ricerca della PrP^{EST} al lungo e costoso saggio biologico (Lee *et al.*, 2000; Foster, 2008), per stimare l'infettività residua.

Occorre tenere in mente che la forma e la taglia molecolare dell'unità infettiva veicolata nel sangue sono di fatto sconosciute e la scelta del tipo e della modalità preparatoria dello *spike* e con esso, implicitamente, dello stato di aggregazione/solubilità dell'unità infettiva, può portare a sovrastimare la capacità effettiva di rimozione dell'infettività ottenuta con un processo fisico (Berardi *et al.*, 2008; Turner & Ludlam, 2009; Yunoki *et al.*, 2010).

Dall'analisi di tutte queste variabili si desume che è arduo poter generalizzare le stime ottenute in termini di biosicurezza dei plasmaderivati prodotti da frazionatori che adottano procedure solo in parte analoghe.

Tuttavia, il processo produttivo dei diversi plasmaderivati (frazionamento alcolico di Cohn) è in grado, potenzialmente, di rimuovere/inattivare frazioni significative dell'infettività prionica contenuta nel plasma. Sperimentazioni animali con roditori hanno mostrato livelli d'infettività decrescenti nell'ordine: *buffy coat* (che contiene le cellule bianche), plasma, crioprecipitato (da cui si estrae il FVIII), frazione I+II+III (sorgente delle IG) e frazione V (fonte di albumina) (Foster *et al.*, 2004; Brown, 2007).

5. ANALISI DEL RISCHIO SANGUE/PLASMA IN ITALIA

Per la valutazione del rischio teorico di contrarre le varie forme di MCJ attraverso l'uso dei plasmaderivati occorre prendere in considerazione i seguenti aspetti:

- i. *Provenienza del sangue/plasma (rischio geografico).*
- ii. *Infettività stimata del sangue/plasma.*
- iii. *Via d'esposizione e durata temporale del trattamento con plasmaderivato.*
- iv. *Capacità del processo produttivo di ridurre l'infettività eventualmente presente nel plasma.*

La valutazione del rischio costruita sull'analisi dei primi tre punti, riferita generalmente come *worst case assumption*, prevede che il carico infettivo stimato nella materia prima di partenza confluisca *tout-court* nel prodotto finito. Sebbene questo tipo di valutazione configuri il peggior scenario possibile, essa rappresenta l'ipotesi più garantista per i pazienti, in stretta applicazione del principio di precauzione.

Tuttavia, una valutazione più realistica assume che il processo produttivo sia in grado di ridurre effettivamente il potenziale infettivo per i diversi plasmaderivati (mediante studi di validazione *ad hoc* in scala ridotta). Si parla in questo caso di stima dell'*infettività residua teorica* per il plasma derivato e di *fattore di riduzione* (FR), espresso in logaritmi (LFR), per il processo produttivo.

Risulta quindi evidente che per valutare correttamente il rischio di trasmettere la MCJ attraverso i plasmaderivati è importante tracciare l'identità e la provenienza geografica delle singole donazioni di plasma costituenti il plasma-pool destinato al frazionamento, procedendo a esaminare caso per caso il rischio specifico associato all'uso di ogni singolo prodotto.

Il plasma frazionato in Italia è per il 70% autoctono e per il restante 30% di provenienza estera (Germania, Austria e Stati Uniti). Inoltre, plasmaderivati provenienti esclusivamente da centri di raccolta dotati di una certificazione europea (*European Good Manufacturing Procedure Certificate*) sono importati e commercializzati come prodotti finiti. Inoltre, negli ultimi anni, in Italia come altrove, si assiste alla sostituzione della terapia con plasmaderivati con analoghi prodotti ricombinanti, al fine di abbattere il rischio infettivo, principalmente rappresentato nel passato dalle infezioni con HIV, HCV, HBV e Parvovirus B19.

5.1. MCJ variante

Non è possibile escludere che anche nel nostro Paese soggetti con MCJ variante preclinica o subclinica donino sangue e plasma. Sulla base dei casi a oggi osservati si può ipotizzare per l'Italia un rischio inferiore di 100 volte paragonato a quello stimato per il Regno Unito e di 10 volte inferiore rispetto alla Francia. Persiste un rischio, anch'esso relativamente basso, per i plasmaderivati prodotti con plasma estero e acquistati da nazioni che hanno una stima di prevalenza di MCJ variante più alta di quella italiana (es. Francia).

5.2. MCJ sporadica

In Italia, l'esposizione all'agente infettivo responsabile della MCJ sporadica attraverso le emotrasfusioni è un evento raro ma possibile. Infatti, sulla base del numero dei donatori nelle classi di età dove l'incidenza della MCJ sporadica è più frequente si stima che sono attesi circa 6 donatori per anno con esordio della MCJ sporadica entro i 5 anni successivi alla donazione. Al fine di valutare l'impatto della MCJ sporadica nelle donazioni di sangue si è stimato il numero di casi di MCJ sporadica (preclinici) tra i donatori italiani. La stima è basata sui dati della distribuzione per età dei donatori italiani (Gonzalez *et al.*, 2005) e dei tassi di incidenza specifici per età dei pazienti con MCJ sporadica in Italia (dati del Registro Nazionale della MCJ) riportati nella Figura 2. La MCJ sporadica colpisce prevalentemente i soggetti di età superiore o uguale a 45 anni. In questa fascia di età è incluso circa il 34% dei donatori italiani.

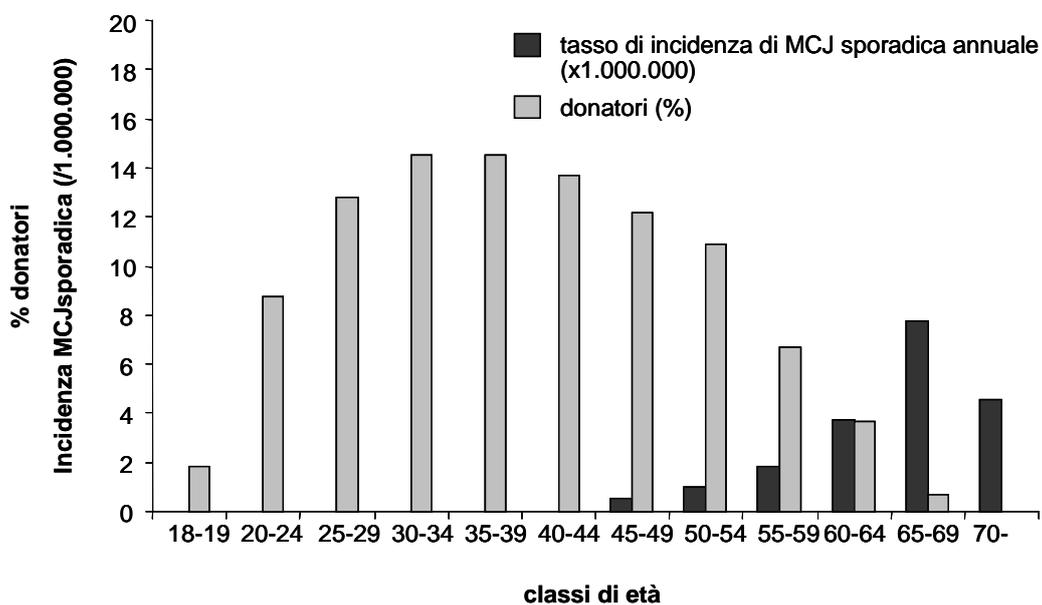


Figura 2. Distribuzione per età dei donatori e tassi specifici per età di incidenza di MCJs

Applicando i tassi di incidenza di MCJ sporadica specifici per età alla distribuzione per età dei donatori si stima che 6 donatori potrebbero sviluppare la MCJ sporadica entro 5 anni dalla donazione, assumendo che il sangue sia infetto fino a 5 anni prima dell'inizio clinico di malattia (Tabella 1).

Queste stime sono state ottenute assumendo il *worst case assumption* rappresentato dall'ipotesi che l'infettività nel sangue di soggetti affetti da MCJ sporadica sia costante negli anni antecedenti l'esordio clinico della malattia. Tuttavia, la stima dell'infettività del sangue nei soggetti preclinici rimane a oggi sconosciuta.

I dati del 2001 possono essere considerati validi per tutti gli anni, dato che non si osservano variazioni significative nella distribuzione per età dei donatori e nei tassi di incidenza specifici per età della MCJ sporadica. Inoltre, estendendo ulteriormente l'intervallo temporale successivo alla donazione, un numero maggiore di donatori potrebbe sviluppare la MCJ sporadica.

Tabella 1. Numero atteso di casi di MCJ sporadica nella coorte dei donatori italiani del 2001 con esordio nel 2001 oppure con esordio 1, 2, 3, 4, 5 anni dopo la donazione del 2001

ETÀ	2001	2002	2003	2004	2005	2006
18-19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
20-24	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
25-29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
30-34	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
35-39	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
40-44	0,000	0,019	0,038	0,058	0,077	0,096
45-49	0,085	0,101	0,116	0,131	0,146	0,162
50-54	0,145	0,168	0,192	0,216	0,239	0,263
55-59	0,161	0,195	0,228	0,262	0,296	0,329
60-64	0,179	0,217	0,255	0,294	0,332	0,370
65-69	0,068	0,063	0,057	0,051	0,046	0,040
70-	-	-	-	-	-	-
TOTALE	0,638	0,763	0,887	1,011	1,136	1,260

5.3. EST genetiche

In Italia è presente un numero elevato di casi di EST genetiche con mutazioni del gene *PRNP* ai codoni 210 (V210I) in Campania e Puglia e 200 (E200K) in Calabria e pertanto è possibile, almeno nelle regioni sopra riportate, che alcuni donatori possano essere portatori sani di una mutazione del gene *PRNP*. Tuttavia, in Italia, come in altri paesi europei e nord-americani, è già prevista la misura precauzionale che vieta ai soggetti che dichiarino di aver avuto un caso di MCJ in famiglia di donare sangue e/o plasma.

5.4. MCJ iatrogena

In Italia a oggi sono stati individuati 6 casi di MCJ iatrogena, tutti associati a impianto di *dura mater* contaminata. Tuttavia, anche in Italia sono previste misure precauzionali che escludono questi soggetti dalle donazioni di sangue.

5.5. Azioni prospettiche da implementare in Italia

Lo studio di *look-back*, recentemente intrapreso in Italia (simile a quelli eseguiti negli Stati Uniti e nel Regno Unito), mira a stabilire se il sangue di soggetti con MCJ sporadica preclinica sia in grado di trasmettere la malattia ai riceventi.

In particolare, si ravvisa la necessità di implementare la raccolta di dati su alcune categorie di pazienti particolarmente esposte al rischio (emofilici, coagulopatici, nati pretermine) per riuscire a incrociare storicamente e prospettivamente i dati sulle donazioni di sangue/plasma e sulle trasfusioni/trattamento con plasmaderivati con i dati del Registro Nazionale della Sorveglianza della MCJ e Sindromi Correlate, prevedendo l'attivazione di percorsi permanenti di *tracing-back: dal batch al paziente* e di *record-keeping*.

CONCLUSIONI

Gli studi sperimentali di trasmissione delle EST umane in modelli animali, mirati a valutare la presenza di infettività nel sangue/plasma, sono molto scarsi e hanno prodotto risultati controversi. L'evidenza sperimentale dell'infettività nei tessuti periferici dei soggetti affetti da MCJ sporadica è scarsa ma i dati disponibili hanno mostrato presenza d'infettività nel tessuto linfoide esaminato *post mortem*, oltre che nella MCJ variante, in altre EST umane (vedere paragrafi 1.1, 1.4, 2.1).

Non può essere escluso che nei pazienti clinicamente affetti da EST umane e nelle fasi terminali di malattia, la PrP^{EST} sia presente nel sangue a livelli molto bassi da non essere misurabile mediante le tecniche attualmente disponibili.

Gli studi osservazionali, riportati in letteratura, non hanno evidenziato alcun caso di trasmissione di MCJ sporadica in soggetti riceventi sangue intero o emocomponenti provenienti da donatori affetti da MCJ sporadica, in fase preclinica e clinica, durante un periodo d'osservazione in alcuni casi superiore a 15 anni. Tuttavia, l'interpretazione dei risultati negativi registrati in questi studi deve tener conto che il 60% dei pazienti sottoposti a trasfusione ha più di 65 anni e che il 50% muore entro 5 anni dalla trasfusione per cause legate alla propria patologia.

A oggi gli studi di *look-back* non possiedono una potenza statistica sufficiente per poter escludere formalmente il rischio di trasmissioni legate al sangue in un piccolo numero di casi; tuttavia, riescono a escludere, con ragionevole certezza, che la trasmissione abbia un'elevata efficienza e/o un breve tempo d'incubazione.

Lo studio osservazionale (caso-controllo) condotto nell'ambito della sorveglianza della MCJ sporadica in Italia, sul rischio legato alle trasfusioni, ha mostrato per la prima volta in letteratura, un possibile rischio associato alle trasfusioni (Puopolo *et al.*, 2011). Tuttavia, come sottolineato in precedenza, non è possibile escludere in questo tipo di studi un condizionamento dei risultati associato alle modalità di rilevazione dei dati e di reclutamento dei soggetti.

I risultati negativi dei precedenti studi epidemiologici condotti in numerosi Paesi sull'associazione tra trasfusione di sangue e MCJ sporadica e l'assenza di evidenza epidemiologica nella popolazione degli emotrasfusi e dei coagulopatici possono aver portato a sovrastimare la biosicurezza del sangue/plasma in relazione alla MCJ sporadica. Occorre, infatti, tener conto della lunga incubazione della malattia – che pone limiti sia nell'osservazione dell'evento sia nell'effettiva ricostruzione dell'esposizione dei soggetti – e di una verosimile non elevata efficienza di trasmissione.

I risultati dello studio italiano suggeriscono cautela nell'interpretazione delle evidenze ad oggi disponibili ed esortano la comunità scientifica e le Autorità Competenti alla conduzione di ulteriori e dedicati studi.

A oggi, dato che non è possibile eseguire una diagnosi preclinica di MCJ per mancanza di test specifici o di un test di screening sul sangue/plasma donato per rivelare la contaminazione da prioni, è impossibile prevenire che il sangue/plasma di donatori in fase preclinica di MCJ sia accidentalmente utilizzato per le trasfusioni o per la produzione di prodotti medicinali plasmaderivati.

I criteri di esclusione dei donatori considerati a rischio di sviluppare la MCJ variante, la MCJ iatrogena e le EST genetiche sono ben stabiliti dalla normativa europea e italiana (vedi paragrafo 3), mentre per la MCJ sporadica non è ancora possibile stabilire quali soggetti siano a rischio.

L'EMA ha raccomandato di operare il ritiro dal commercio dei plasmaderivati solo nel caso in cui venga identificata nel plasma-pool la donazione di plasma di un soggetto scoperto affetto

da MCJ variante. Nel caso in cui nel plasma-pool sia verificata la presenza di plasma proveniente da un donatore con diagnosi di MCJ sporadica, MCJ iatrogena o EST genetiche, puntuali e accurate valutazioni, sono necessarie per garantire ai pazienti la bio-sicurezza dei plasmaderivati e allo stesso tempo la disponibilità sul mercato di prodotti medicinali essenziali, per i quali non sono disponibili alternative.

L'implementazione di azioni appropriate in relazione alla MCJ muove dalla diagnosi accurata nei casi sospetti. Esiste la possibilità di confusione diagnostica tra MCJ sporadica e MCJ variante, particolarmente nei pazienti di giovane età.

Le Autorità Competenti potrebbero per ragioni precauzionali procedere al ritiro dei lotti di plasmaderivati se nel plasma-pool da cui sono stati ricavati è identificata una donazione proveniente da un soggetto che manca di una diagnosi definitiva di MCJ (ottenuta attraverso l'esame neuropatologico e la caratterizzazione biochimica della PrP^{EST} nel tessuto cerebrale) o che risulti affetto da MCJ sporadica atipica.

BIBLIOGRAFIA

- EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe. *The Collection, Testing and Use of Blood and Blood Components in Europe. 2006 Report*. Disponibile all'indirizzo: www.edqm.eu/medias/fichiers/The_Collection_Testing_and_Use_of_Blood_and_Blood_1.pdf; ultima consultazione 26/04/2011.
- AFSSAPS. *Analysis of the risk of transmission of variant of Creutzfeldt-Jakob disease by health products and by tissues and fluids of human origin update of findings of ad hoc group report of December 2000. Report of February 2004*. Disponibile all'indirizzo: www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/2906328b3b0e08c665a7c7b0e5c42020.pdf; ultima consultazione 22/04/2011.
- Balkema-Buschmann A, Eiden M, Hoffmann C, Kaatz M, Ziegler U, Keller M, Groschup MH. BSE infectivity in the absence of detectable PrPSc accumulation in the tongue and nasal mucosa of terminally diseased cattle. *J Gen Virol* 2011; 92:467-76.
- Barash JA, Johnson BT, Gregorio DI. Is surgery a risk factor for Creutzfeldt-Jakob disease? Outcome variation by control choice and exposure assessments. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:212-8.
- Bennet P, Ball J. *vCJD Risk Assessment Calculations for a Patient with Multiple Routes of Exposure*. London: Department of Health; 2009. Disponibile all'indirizzo: www.dh.gov.uk/prod_consum_dh/groups/dh_digitalassets/documents/digitalasset/dh_100337.pdf; ultima consultazione 22/04/2011.
- Berardi VA, Cardone F, Valanzano A, Lu M, Pocchiari M. Preparation of soluble infectious samples from scrapie-infected brain: a new tool to study the clearance of transmissible spongiform encephalopathy agents during plasma fractionation. *Transfusion* 2006; 46:652-8.
- Bishop MT, Hart P, Aitchison L, Baybutt HN, Plinston C, Thomson V, Tuzi NL, Head MW, Ironside JW, Will RG, Manson JC. Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol* 2006;5:393-8.
- Bishop MT, Ritchie DL, Will RG, Ironside JW, Head MW, Thomson V, Bruce M, Manson JC. No major change in vCJD agent strain after secondary transmission via blood transfusion. *PLoS One* 2008;3(8):e2878.
- Bons N, Lehmann S, Mestre-Francès N, Dormont D, Brown P. Brain and buffy coat transmission of bovine spongiform encephalopathy to the primate *Microcebus murinus*. *Transfusion* 2002;42:513-6.
- Brandel JP, Heath CA, Head MW, Levavasseur E, Knight R, Laplanche JL, Langeveld JP, Ironside JW, Hauw JJ, Mackenzie J, Alperovitch A, Will RG, Haik S. Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain. *Ann Neurol* 2009;65:249-256.
- Brown P, Brandel JP, Preece M, Sato T. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: the waning of an era. *Neurology* 2006;67:389-93.
- Brown P, Cervenáková L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, Drohan WN (1999). Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion* 1999;39:1169-78.
- Brown P, Gibbs CJ, Johnson PR, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG, Gajdusek DC. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 1994;35:513-29.
- Brown P, Rohwer RG, Dunstan BC, MacAuley C, Gajdusek DC, Drohan WN. The distribution of infectivity in blood components and plasma derivatives in experimental models of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 1998;38:810-16.
- Brown P. Can CJD be Transmitted by Transfusion? *Curr Opin Hematol* 1995;2:472-7.

- Brown P. Creutzfeldt-Jakob Disease: blood infectivity and screening tests. *Semin Haematol* 2001;38:2-6.
- Brown P. Creutzfeldt-Jakob disease: reflections on the risk from blood product therapy. *Haemophilia* 2007;13:33-40.
- Brown P. The risk of blood-borne Creutzfeldt-Jakob disease. *Dev Biol (Basel)* 2000;102:53-9.
- Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 2001;358:208-9.
- Burnouf T & Padilla A (2006). Current strategies to prevent transmission of prions by human plasma derivatives. *Transfus Clin Biol* 2006;13:320-8.
- Cali I, Castellani R, Alsheklee A, Cohen Y, Blevins J, Yuan J, Langeveld JP, Parchi P, Safar JG, Zou WQ, Gambetti P. Co-existence of scrapie prion protein types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: its effect on the phenotype and prion-type characteristics. *Brain* 2009;132:2643-58.
- Canadian Blood Service. *vCJD FAQs 2009 Update*. Disponibile all'indirizzo: www.blood.ca/centreapps/internet/uw_v502_mainengine.nsf/page/Creutzfeldt+Jakob+Disease+-+FAQ?OpenDocument#08; ultima consultazione 26/04/2011.
- Casaccia P, Ladogana A, Xi YG, Pocchiari M. Levels of infectivity in the blood throughout the incubation period of hamsters peripherally injected with scrapie. *Arch Virol* 1989;108:145-9.
- Cervenakova L, Yakovleva O, McKenzie C, Kolchinsky S, McShane L, Drohan WN, Brown P. Similar levels of infectivity in the blood of mice infected with human-derived vCJD and GSS strains of transmissible spongiform encephalopathy. *Transfusion* 2003;43:1687-94.
- Chadeau-Hyam M & Alperovitch A. Risk of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in France. *Int J Epidemiol* 2005;34:46-52.
- Chohan G, Llewelyn C, Mackenzie J, Cousens S, Kennedy A, Will R, Hewitt P. Variant Creutzfeldt-Jakob disease in a transfusion recipient: coincidence or cause? *Transfusion* 2010;50:1003-6.
- CJD Incidents Panel (CJDIP), UK Health Protection Agency. *Assessment of exposure to particular batches of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) implicated plasma products*. 2004. Disponibile all'indirizzo: http://www.wfh.org/2/docs/Safety_Supply/vCJD_Incidents_panel.pdf; ultima consultazione 17/05/2011.
- Clewley JP, Kelly CM, Andrews N, Vogliqi K, Mallinson G, Kaisar M, Hilton DA, Ironside JW, Edwards P, McCardle LM, Ritchie DL, Dabaghian R, Ambrose HE, Gill ON. Prevalence of disease related prion protein in anonymous tonsil specimens in Britain: cross sectional opportunistic survey. *BMJ* 2009;338:1316-21.
- Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP. Kuru in the 21st century - an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* 2006;367:2068-74.
- Collins S, Law, MG, Fletcher A, Boyd A, Kaldor J, Masters CL. Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Lancet* 1999;353:693-7.
- Créange A, Gray F, Cesaro P, Adle-Biassette H, Duvoux C, Cherqui D, Bell J, Parchi P, Gambetti P, Degos JD. Creutzfeldt-Jakob disease after liver transplantation. *Ann Neurol* 1995;38:269-72.
- Deslys SP, Lasmézas C, Dormont D. Selection of specific strains in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1994;343:848.
- Det Norske Veritas *Risk Assessment of Exposure to vCJD Infectivity in Blood and Blood Products*. Oslo: DNV; 2003.
- Dorsey K, Zou S, Schonberger LB, Sullivan M, Kessler D, Notari E 4th, Fang CT, Dodd RY. Lack of evidence of transfusion transmission of Creutzfeldt-Jakob disease in a US surveillance study. *Transfusion* 2009;49:977-84.

- Dorsey K, Zou S, Schonberger LB, Sullivan M, Kessler D, Notari E 4th, Fang CT, Dodd RY. Lack of evidence of transfusion transmission of Creutzfeldt-Jakob disease in a US surveillance study. *Transfusion* 2009;49:977-84.
- El-Shanawany T, Jolles S, Unsworth DJ, Williams P. A recipient of immunoglobulin from a donor who developed vCJD. *Vox Sang* 2009;96:270.
- Esmonde TF, Will RG, Slattery JM, Knight R, Harries-Jones R, de Silva R, Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet* 1993;341:205-7.
- European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General, SCENIHR. *Opinion on the Safety of Human-derived Products with regard to Variant Creutzfeldt-Jakob Disease adopted on 28-29 September 2005*. Disponibile all'indirizzo: ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_004.pdf; ultima consultazione 21/04/2011.
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. Council of Europe (EDQM). *The Collection, Testing and Use of Blood and Blood Components in Europe. 2006 Report*. Disponibile all'indirizzo: www.edqm.eu/medias/fichiers/The_Collection_Testing_and_Use_of_Blood_and_Blood_1.pdf; ultima consultazione 26/04/2011.
- European Medicines Agency. *CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products*. EMEA/CPMP/BWP/2879/02. 2003. Disponibile all'indirizzo: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003792.pdf; ultima consultazione 22/04/2011.
- European Medicines Agency. *CHMP Position Statement on Creutzfeldt-Jacob and plasma-derived and urine-derived medicinal products*. EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 1. 2004. Disponibile all'indirizzo: www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pos/287902enfin.pdf; ultima consultazione 19/04/2011.
- European Medicines Agency. *CHMP position statement on Creutzfeldt-Jakob disease and plasma-derived and urine-derived medicinal products*. EMEA/CPMP/BWP/2879/02/rev 2. 2010. Disponibile all'indirizzo: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/07/WC500095070.pdf; ultima consultazione 22/04/2011.
- Evatt B, Austin H, Barnhart E, Schonberger L, Sharer L, Jones R, DeArmond S. 1998). Surveillance for Creutzfeldt-Jakob disease among persons with hemophilia. *Transfusion* 1998;38:817-20.
- FDA. *Draft Guidance for Industry: Amendment (Donor Deferral for Transfusion in France Since 1980) to "Guidance for Industry: Revised Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products*. Washington: Food and Drug Administration; 2006. Disponibile all'indirizzo: www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/BloodSafety/ucm095158.pdf; ultima consultazione 22/04/2011.
- FDA. *Guidance for Industry Revised Preventive Measures to Reduce the Possible Risk of Transmission of Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) and Variant Creutzfeldt-Jakob Disease (vCJD) by Blood and Blood Products*. Washington: Food and Drug Administration; 2002. Disponibile all'indirizzo: www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/SafetyAvailability/BloodSafety/ucm095181.pdf; ultima consultazione 26/04/2011.
- Flan B & Arrabal S. Manufacture of plasma-derived products in France and measures to prevent the risk of vCJD transmission: Precautionary measures and efficacy of manufacturing processes in prion removal. *Transfus Clin Biol* 2007;14:51-62.
- Foster PR. Removal of TSE agents from blood products. *Vox Sang* 2004; 87:7-10.
- Foster PR. Selection of spiking materials for studies on the clearance of agents of transmissible spongiform encephalopathy during plasma fractionation. *Biologicals* 2008;36:142-3.
- Gajdusek DC & Gibbs CJ Jr. Transmission of two subacute Spongiform Encephalopathies of man (Kuru and Creutzfeldt-jakob disease) to new world monkeys. *Nature* 1971;230:588-91.

- Gillies M, Chohan G, Llewelyn CA, MacKenzie J, Ward HJ, Hewitt PE, Will RG. A retrospective case note review of deceased recipients of vCJD-implicated blood transfusions. *Vox Sang* 2009;97:211-8.
- Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *New Engl J Med* 2003;349:1812-20.
- Gonzalez M, Règine V, Piccinini V, Vulcano F, Giampaolo A, Hassan HJ. Residual risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in Italy. *Transfusion* 2005;45:1670-5.
- Goudemand J, Scharrer I, Berntorp E, Lee CA, Borel-Derlon A, Stieltjes N, Caron C, Scherrmann JM, Bridey F, Tellier Z, Federici AB, Mannucci PM. Pharmacokinetic studies on Wilfactin, a von Willebrand factor concentrate with a low factor VIII content treated with three virus inactivation/removal methods. *J Thromb Haemost* 2005;3:2219-27.
- Gravenor MB, Stallard N, Curnow R, McLean AR. Repeated challenge with prion disease: the risk of infection and impact on incubation period. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:10960-5.
- Gregori L, Lambert BC, Gurgel PV, Gheorghiu L, Edwardson P, Lathrop JT, Macauley C, Carbonell RG, Burton SJ, Hammond D, Rohwer RG. Reduction in infectivity of endogenous transmissible spongiform encephalopathies present in blood by adsorption to selective affinity resins. *Lancet* 2006;368:2226-30.
- Gregori L, McCombie N, Palmer D, Birch P, Sowemimo-Coker SO, Giulivi A, Rohwer RG. Effectiveness of leucoreduction for removal of infectivity of transmissible spongiform encephalopathies from blood. *Lancet* 2004;364:529-31.
- Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I, Nakamura Y, Sato T, Kitamoto T, Mizusawa H, Yamada M. (2009). Medical Procedures and Risk for Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease, Japan, 1999-2008. *Emerg Infect Dis* 2009;15:265-71.
- Head MW, Ritchie D, Smith N, McLoughlin V, Nailon W, Samad S, Masson S, Bishop M, McCardle L, Ironside JW. Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: An immunohistochemical, quantitative, and biochemical study. *Am J Pathol* 2004;164:143-53.
- Herzog C, Rivière J, Lescoutra-Etcheagaray N, Charbonnier A, Leblanc V, Salès N, Deslys JP, Lasmézas CI. PrP^{TSE} Distribution in a Primate Model of Variant, Sporadic, and Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease. *J Virol* 2005;79:1433-45.
- Herzog C, Salès N, Etcheagaray N, Charbonnier A, Freire S, Dormont D, Deslys JP, Lasmézas CI. Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy agent in primates after intravenous or oral infection. *Lancet* 2004;363:422-8.
- Hewitt PE, Llewelyn CA, Mackenzie J, Will RG. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study. *Vox Sang* 2006;91:221-30.
- Heye N, Hensen S, Müller N. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet* 1994;343:298-9.
- Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ, Frosh A, Tolley N, Bell JE, Spencer M, King A, Al-Sarraj S, Ironside JW, Lantos PL, Collinge J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999;353:183-9.
- Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci US* 2000;97:10248-53.
- Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J. (1998). Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1998;352:703-4.
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 2004;203:733-9.

- Holada K, Vostal JG, Theisen PW, MacAuley C, Gregori L, Rohwer RG. Scrapie infectivity in hamster blood is not associated with platelets. *J Virol* 2002;76:4649-50.
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 2000;356:999-1000.
- Houston F, McCutcheon S, Goldmann W, Chong A, Foster J, Sisó S, González L, Jeffrey M, Hunter N. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood* 2008;112:4739-45.
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 2002;83:2897-905.
- Ironside JW, Bishop MT, Connolly K, Hegazy D, Lowrie S, Le Grice M, Ritchie DL, McCardle LM, Hilton DA. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study. *BMJ* 2006;332:1186-8.
- Jacquemot C, Cuhe C, Dormont D, Lazarini F. High incidence of scrapie induced by repeated injections of subinfectious prion doses. *J Virol* 2005;79:8904-8.
- Joiner S, Linehan J, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J. Irregular presence of abnormal prion protein in appendix in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:597-8.
- Kaski S, Mead S, Hyare H, Cooper S, Jampana R, Overell J, Knight R, Collinge J, Rudge P. Variant CJD in an individual heterozygous for *PRNP* codon 129. *Lancet* 2009;374:2128.
- Key NS & Negrier C. Coagulation factor concentrates: past, present, and future. *Lancet* 2007;370:439-48.
- Klein R & Dumble LJ. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 1993;341:768.
- Kleinman S, Marshall D, AuBuchon J, Patton M. Survival after transfusion as assessed in a large multistate US cohort. *Transfusion* 2004;44:386-90.
- Kondo K & Kuroiwa Y. A case control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries. *Ann Neurol* 1982;11:377-381.
- La Bella V, Collinge J, Pocchiari M, Piccoli F. Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an Italian woman. *Lancet* 2002;360:997-8.
- Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, *et al.* Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 2005;64:1586-91.
- Lasmézas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 1997;275:402-5.
- Lasmézas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marcé D, Lamoury F, Kopp N, Hauw JJ, Ironside J, Bruce M, Dormont D, Deslys JP. Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4142-7.
- Lee CA, Ironside JW, Bell JE, Giangrande P, Ludlam C, Esiri MM, McLaughlin JE. Retrospective neuropathological review of prion disease in UK haemophilic patients. *Thromb Haemost* 1998;80:909-11.
- Lee DC, Stenland CJ, Hartwell RC, Ford EK, Cai K, Miller JL, Gilligan KJ, Rubenstein R, Fournel M, Petteway SR Jr. Monitoring plasma processing steps with a sensitive western blot assay for the detection of the prion protein. *J Virol Methods* 2000;84:77-89.
- Lefrère JJ & Hewitt P. From mad cows to sensible blood transfusion: the risk of prion transmission by labile blood components in the United Kingdom and in France. *Transfusion* 2009;49:797-812.
- Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J, Will RG. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004;363:417-21.
- Ludlam CA & Turner ML. Managing the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood products. *Br J Haematol* 2006;132:13-24.

- Manuelidis EE, Kim JH, Mericangas JR, Manuelidis L. Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. *Lancet* 1985;2: 896-7.
- Menache D & O'Malley JP. Creutzfeldt-Jakob Disease: Current U.S. Policy to Further Reduce the Possible Risk of Transmission by Transfusion. *Biologicals* 1996;24:277-83.
- Operskalski EA & Mosley JW. Pooled plasma derivatives and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1995;346:1224.
- Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretzschmar H. Typing prion isoforms. *Nature* 1997;386:232-4.
- Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, Petersen RB, Gambetti P. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996;39:767-78.
- Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999;46:224-33.
- Peden A, McCardle L, Head MW, Love S, Ward HJ, Cousens SN, Keeling DM, Millar CM, Hill FG, Ironside JW. Variant CJD infection in the spleen of a neurologically asymptomatic UK adult patient with haemophilia. *Haemophilia* 2010;16:296-304.
- Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004;264:527-9.
- Peden AH, Ritchie DL, Head MW, Ironside JW. Detection and Localization of PrP^{Sc} in the Skeletal Muscle of Patients with Variant, Iatrogenic, and Sporadic Forms of Creutzfeldt-Jakob Disease. *Am J Pathol* 2006;168:927-35
- Piccardo P, Manson JC, King D, Ghetti B, Barron RM. Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:4712-7.
- Pocchiari M, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Gelpi E, Collins S, Lewis V, Sutcliffe T, Guilivi A, Delasnerie-Laupretre N, Brandel JP, Alperovitch A, Zerr I, Poser S, Kretzschmar HA, Ladogana A, Rietvald I, Mitrova E, Martinez-Martin P, de Pedro-Cuesta J, Glatzel M, Aguzzi A, Cooper S, Mackenzie J, van Duijn CM, Will RG. Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 2004;127:2348-59.
- Pocchiari M. Prevalence of variant CJD in the UK. *BMJ* 2009;21:338:b435.
- Puopolo M, Ladogana A, Vetrugno V, Pocchiari M. Transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion: risk factor or possible biases. *Transfusion* 2011; in press.
- Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 2001;75:10106-12.
- Reichl HE, Foster PR, Welch AG, Li Q, MacGregor IR, Somerville RA, Fernie K, Steele PJ, Taylor DM. Studies on the removal of a bovine spongiform encephalopathy-derived agent by processes used in the manufacture of human immunoglobulin. *Vox Sang* 2002;83:137-145.
- Ricketts MN, Cashman NR, Stratton EE, ElSaadany S. Is Creutzfeldt-Jakob Disease Transmitted in Blood? *Emerg Inf Dis* 1997;3:155-63.
- Ritchie DL, Boyle A, McConnell I, Head MW, Ironside JW, Bruce ME. Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue show uniform and conserved BSE-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice. *J Gen Virol* 2009;90:3075-3082.

- Ruegger J, Stoeck K, Amsler L, Blaettler T, Zwahlen M, Aguzzi A, Glatzel M, Hess K, Eckert T. A case-control study of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in Switzerland: analysis of potential risk factors with regard to an increased CJD incidence in the years 2001-2004. *BMC Public Health* 2009;9:18.
- Seitz R, von Auer F, Blümel J, Burger R, Buschmann A, Dietz K, Heiden M, Hitzler WE, Klamm H, Kreil T, Kretzschmar H, Nübling M, Offergeld R, Pauli G, Schottstedt V, Volkers P, Zerr I. Impact of vCJD on blood supply. *Biologicals* 2007;35:79-97.
- Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF, Caughey B. The most infectious prion protein particles. *Nature* 2005;437:257-61.
- Sisò S, González L, Houston F, Hunter N, Martin S, Jeffrey M. The neuropathologic phenotype of experimental ovine BSE is maintained after blood transfusion. *Blood* 2006;108:745-8.
- Somerville RA, Oberthur RC, Havekost U, MacDonald F, Taylor DM, Dickinson AG. Characterization of thermodynamic diversity between transmissible spongiform encephalopathy agent strains and its theoretical implications. *J Biol Chem* 2002;277:11084-9.
- Tamai Y, Kitajima R, Taguchi F, Ohtani Y, Kawaguchi T, Miura S, Sato M, Ishihara Y. Demonstration of the transmissible agent in tissue from a pregnant woman with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1992;327:649.
- Tateishi J. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. *Lancet* 1985;2:1074.
- Thyer J, Unal A, Thomas P, Eaton B, Bhashyam R, Ortenburg J, Uren E, Middleton D, Selleck P, Maher D. Prion-removal capacity of chromatographic and ethanol precipitation steps used in the production of albumin and immunoglobulins. *Vox Sang* 2006;91:292-300.
- Turner ML & Ludlam CA. An update on the assessment and management of the risk of transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood and plasma products. *Br J Haematol* 2009;144:14-23.
- Vamvakas EC. Universal White Blood Cell Reduction in Europe: Has Transmission of Variant Creutzfeldt- Jakob Disease Been Prevented? *Transfus Med Rev* 2011;25:133-44 *in press*.
- van Duijn CM, Delasnerie-Lauprêtre N, Masullo C, Zerr I, de Silva R, Wientjens DP, *et al*. Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *Lancet* 1998;351:1081-5.
- Wadsworth JD, Joiner S, Fox K, Linehan JM, Desbruslais M, Brandner S, Asante EA, Collinge J. Prion infectivity in variant Creutzfeldt-Jakob disease rectum. *Gut* 2007;56:90-4.
- Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ, Collinge J. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001;358:171-80.
- Wadsworth JD, Joiner S, Linehan JM, Desbruslais M, Fox K, Cooper S, Cronier S, Asante EA, Mead S, Brandner S, Hill AF, Collinge J. Kuru prions and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease prions have equivalent transmission properties in transgenic and wild-type mice. *PNAS* 2008;105:3885-90.
- Ward HJ, Everington D, Cousens SN, Smith-Bathgate B, Gillies M, Murray K, Knight RS, Smith PG, Will RG. Risk factors for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2008;63:347-54.
- Ward HJ, MacKenzie JM, Llewelyn CA, Knight RS, Hewitt PE, Connor N, Molesworth A, Will RG. Variant Creutzfeldt-Jakob disease and exposure to fractionated plasma products. *Vox Sang* 2009;97:207-10.
- WHO. *WHO Guidelines on Transmissible Spongiform Encephalopathies in relation to Biological and Pharmaceutical Products*. Geneva: World Health Organization; 2003. Disponibile all'indirizzo: www.who.int/immunization_standards/vaccine_regulation/BLOOD_TSE_2003.pdf; ultima consultazione 22/04/2011.
- Wientjens DP, Davanipour Z, Hofman A, Kondo K, Matthews WB, Will RG, van Duijn CM. Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies. *Neurology* 1996;46:1287-91.

- Will R, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996;347:921-5.
- Wilson K, Code C, Ricketts MN. Risk of acquiring Creutzfeldt-Jakob disease from blood transfusions: systematic review of case-control studies. *BMJ* 2000;321:17-9.
- Wroe SJ, Pal S, Siddique D, Hyare H, Macfarlane R, Joiner S, Linehan JM, Brandner S, Wadsworth JD, Hewitt P, Collinge J. Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet* 2006;368:2061-7.
- Yunoki M, Tanaka H, Urayama T, Kanai Y, Nishida A, Yoshikawa M, Ohkubo Y, Kawabata Y, Hagiwara K, Ikuta K. Infectious prion protein in the filtrate even after 15 nm filtration. *Biologicals* 2010;38:311-3.
- Zanusso G, Polo A, Farinazzo A, Nonno R, Cardone F, Di Bari M, Ferrari S, Principe S, Gelati M, Fasoli E, Fiorini M, Prelli F, Frangione B, Tridente G, Bentivoglio M, Giorgi A, Schininà ME, Maras B, Agrimi U, Rizzuto N, Pocchiari M, Monaco S. Novel prion protein conformation and glycoform in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 2007;64:595-9.
- Zou WQ & Gambetti P. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease: French versus British. *Ann Neurol* 2009;65:233-5.