

Rivista Scientifica

Igiene e Sanità Pubblica

fondata nel 1945 da Gaetano Del Vecchio
già diretta da Gaetano e Vittorio Del Vecchio



*Custodit vitam qui custodit sanitatem
Sed prior est sanitas quam sit curatio morbi
(Flos Medicinae Scholae Salerni)*

**ESTRATTO (Traduzione integrale)
in formato elettronico autorizzato dagli Autori e dall'Editore**

Jung MJ., Pistolesi D. and Panà A.

Prioni, malattie da prioni e decontaminazione

Periodico bimestrale
Volume LIX - N. 5 - Settembre / Ottobre 2003
IgSanPubbl - Issn 0019-1639
www.igiene.org

Igiene e Sanità Pubblica

Fascicolo realizzato con il contributo del CIFAPPS - Centro Interdipartimentale Formazione, Aggiornamento e Promozione delle Professioni Sanitarie dell'Università di Roma Tor Vergata

Direttore Responsabile
Augusto Panà

Direttore Editoriale
Armando Muzzi

Redazione
*Cattedra di Igiene e Medicina Preventiva
Università di Roma Tor Vergata*

Comitato Scientifico
Giovanni Berlinguer, Antonio Boccia,
Vittorio Carreri, Gaetano M. Fara,
Bertram Flehmig, Giuseppe Giammanco,
Antonino Gullotti, Elio Guzzanti,
Alessandro Maida, Marck McCarthy,
Cesare Meloni, Bruno Paccagnella,
Walter Ricciardi, Gianfranco Tarsitani,
Giancarlo Vanini

Redazione Sito Internet
Giulia Zamponi

Traduzioni a cura di
Henrike Berg, Steffen P. Berg, Ilaria Restifo

Impaginazione e Grafica
Ornella Fassio

Norme editoriali in 3ª di copertina.

Hanno collaborato a questo numero
G. Aggazzotti, U.L. Aparo, M. Bicocchi,
L. Bigliardi, G. Bornacina, L. Cavazzuti,
E. Colzani, M.L. De Marchi, M. Fanti,
E. Ghirardi, A. Giordano, A. Ianni,
M.J. Jung, G. Leigheb, N. Losio, M. Luparia,
S. Marchisio, M. Minola, A. Muzzi,
A. Panà, M. Panella, D. Pistolesi,
M. Renna, C. Renzi, E. Righi, E. Saccani,
G. Sansebastiano, D. Sarasino,
C. Signorelli, S. Tabolli, E. Vecchi, R. Zoni

IGIENE E SANITÀ PUBBLICA È INDICIZZATA SU MEDLINE E INDEX MEDICUS.

Garanzia di riservatezza

Il trattamento dei dati personali che riguardano Autori e Abbonati viene svolto nel rispetto di quanto stabilito dalla Legge n. 675 del 1996 sulla Tutela dei dati personali. I dati non saranno comunicati o diffusi a terzi e per essi l'Autore o l'Abbonato potrà richiedere, in qualsiasi momento, la modifica o la cancellazione, scrivendo all'Editore.

Igiene e Sanità Pubblica - Periodico bimestrale a carattere scientifico

Reg. Trib. di Roma n. 4198 del 19.10.1954

Proprietà artistica e letteraria riservata

Accreditato SItI - Società Italiana di Igiene, Medicina Preventiva e Sanità Pubblica

Prioni, malattie da prioni e decontaminazione

Jung MJ.⁽¹⁾, Pistolesi D.⁽²⁾ and Panà A.⁽³⁾

⁽¹⁾ CH-8800 THALWIL/SVIZZERA SÄUMERSTRASSE 45 (FOR REPRINTS)

⁽²⁾ FEDEGARI SpA, ALBUZZANO PAVIA

⁽³⁾ CATTEDRA D'IGIENE, UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

Parole chiave *Decontaminazione da prioni in ospedale*

Riassunto I prioni sono estremamente resistenti ai sistemi di disinfezione e sterilizzazione normalmente usati. La proteina prionica patogena è costituita da 142 aminoacidi, è resistente agli enzimi proteolitici, ha una massa di 15 picogrammi ed è filtrabile. Se fissata mediante l'essiccamento o con sostanze chimiche essa può mantenere il suo grado di infettività per anni. Sopravvive al calore secco a 200°C per 1-2 ore. I prioni si fissano in pochi minuti sull'acciaio inossidabile e rimangono infettivi per lungo tempo. Le loro proprietà patologiche derivano dalla struttura spaziale terziaria che è specifica e sperimentalmente trasmissibile. La decontaminazione dei prioni costituisce il problema più rilevante poiché niente o molto poco è stato fatto nella maggior parte degli ospedali per prevenire la trasmissione iatrogena. Il numero dei pazienti potenzialmente infetti non è conosciuto; In ogni caso pazienti che hanno subito interventi di neurochirurgia o dell'apparato laringeo ed oftalmico, trattamenti ortodontali, applicazioni endoscopiche o che hanno subito anestesie, dovrebbero essere considerati gruppi a rischio anche se clinicamente privi di sintomi da prioni. L'uso di strumentario medico a perdere non può costituire la risposta decisiva e le classiche procedure di decontaminazione soprattutto per certi strumentari medici è ancora di estrema importanza. In questo lavoro viene descritta la notevole capacità di decontaminazione degli autoclavi Fedegari che costituiscono il migliore sistema oggi per la decontaminazione dei prioni nella pratica ospedaliera. I costi di investimento sono moderati e l'uso è semplice e accurato; Il loro uso è particolarmente adatto in piccole unità mediche specializzate

Prions, prion diseases and decontamination

Keywords *Prions decontamination in hospital units*

Summary Prions are extremely resistant to disinfection and sterilization methods used so far. The pathogenic prion protein core (called prion) consists of 142 aminoacids, is resistant to proteolytic enzymes, has a mass of 15 pikograms and is filtrabile. Fixed by dessication or chemicals may retain infectivity for years. It survives dry heat at 200 °C for 1-2 hours. Prions are fixed to stainless steel within minutes and remain infectious for long periods. Their pathogenetic properties depend on tertiary spatial structure (conformation) which is specific and transmissible in experiment. The prion decontamination appears by far the most important area of the prion science because very little, or nothing, has been done in the majority of world hospitals to prevent iatrogenic transmission. The number of potentially infectious patients is not known. Therefore, patients undergoing neurosurgery, laryngeal or ophthalmic operations, orthodontal treatments and even anaesthetic or endoscopic applications should be classified into risk groups, even if clinically prion-disease inapparent. The use (or misuse) of disposable instruments is certainly not the final answer for all cases and classic decontamination procedures, if possible because of the character of medical devices, appear still of greatest importance. We consider the high pathogen safety (HPS) autoclave from FEDEGARI as

the best actual equipment for the effective decontamination of prions in the hospital practice. The investment costs are moderate and the handling is simple but must be careful. It appears practicable even in small specialized units.

Prions , Maladies à Prions et Décontamination

Mots-clé Décontamination à prions dans les Hôpitaux

Résumé Les prions sont extrêmement résistants aux systèmes de désinfection et de stérilisation que l'on utilise couramment. La protéine pathogène du prion consiste à 142 aminoacides; elle est résistante aux enzymes protéolytiques, a une masse de 15 picogrammes et peut être filtrée. Lorsqu'elle est fixée par le séchage, ou bien par des substances chimiques, elle peut garder son degré d'infectiosité pendant des années. Elle survit à la chaleur sèche à 200°C pendant une ou deux heures. En quelques minutes seulement, les prions peuvent se fixer sur l'acier inoxydable et rester infectieux longtemps. Leur propriétés pathologiques tiennent à une structure spatiale tridimensionnelle et spécifique qui peut être transmise expérimentalement. La décontamination des prions reste un problème important puisque dans la plupart des hôpitaux il n'y a pas eu de mesures efficaces pour prévenir la transmission iatrogène. Le nombre des patients potentiellement infectés est encore inconnu. De toute manière, les patients qui ont été soumis à des soins neurochirurgicaux, à des interventions aux appareils laryngien et ophtalmique, à des traitements orthodontiques, à une chirurgie endoscopique ou à des anesthésies, doivent être considérés comme des groupes à risque, bien que cliniquement ils ne montrent aucun symptôme à prions. Le recours aux instruments chirurgicaux ne peut pas être considéré comme une solution définitive. Ainsi, les procédures traditionnelles de décontamination restent fondamentales, surtout en ce qui concerne certains instruments médicaux. Dans cette étude, les auteurs décrivent la capacité de décontamination des Autoclaves Fedegari, qui sont à présent le système le meilleur pour la décontamination des prions dans des milieux hospitaliers. Le coût d'investissement est assez modéré et leur emploi est facile et précis. En particulier, elles sont indiqués pour les petites unités médicales spécialisées.

Prionen ,prionenkrankheiten und dekontaminierung-methoden

Schusselwörter Prionen dekontaminierung in Sterilizationabteilungen

Zusammenfassung Prionen sind äusserst resistent gegen bisher angewendete Desinfektions- und Sterilisationsmethoden. Das pathogene Prion Kern-Protein besteht aus 142 Aminosäuren und ist resistent gegen proteolytische Enzyme. Es wiegt 15 Pikogram und ist filtrierbar. Durch Austrocknung oder chemisch fixierte Prionen behalten ihre Infektiosität über Jahre, und sie überstehen trockene Hitze (200°C) bis zwei Stunden. Prionen setzen sich minutenschnell fest an rostfreiem Stahl und bleiben längere Zeit infektiös. Ihre Pathogenität ist auf die räumliche Struktur (Konformation) zurückzuführen, die spezifisch ist und die im Experiment übertragbar ist. Die Inaktivierung von Prionen scheint der wichtigste Bereich der Prionenforschung zu werden, weil in den meisten Spitälern der Welt wenig oder nichts unternommen wurde, um iatrogene Übertragungen zu verhindern. Die Zahl der potentiell infektiösen Patienten ist nicht bekannt. Daher sollten Patienten, die sich neurochirurgischen Eingriffen, oder Eingriffen am Kehlkopf oder am Auge, Kieferoperationen und Anästesie oder Endoskopie-Behandlungen unterziehen, als Risiko-Gruppen eingestuft werden, selbst wenn sich eine Prion-Erkrankung klinisch nicht manifestiert. Der Gebrauch (oder Missbrauch) von Einweg-Instrumenten ist sicher nicht die endgültige Antwort für alle Anwendungen und klassische, den Eigenschaften von medizinischen Instrumenten angepasste Dekontaminierungs-Methoden sind immer noch von grösster Wichtigkeit. Wir beurteilen den HPS (High Pathogen Safety) Autoklav der Firma FEDEGARI als die zur Zeit beste Ausrüstung zur wirksamen Inaktivierung von Prionen für Spitäler. Die Anschaffungskosten sind zumutbar und die Bedienung ist einfach, muss aber zuverlässig erfolgen. Der HPS Autoklav eignet sich auch für kleine spezialisierte Abteilungen.

Introduzione

I prioni sono nuovi patogeni infettivi responsabili di fatali malattie neurovegetative sulla base di un meccanismo completamente nuovo

Essi sono privi di acidi nucleici in quanto resistenti a tutti i metodi che inattivano tale materiale genetico ^(1,2). Si formano per post- traslazione (sintesi successiva di proteine) mediante la trasformazione di una normale proteina prionica cellulare, la PrP^C, codificata dall'exone 2 del gene prionico PRNP ⁽³⁾, in una proteina isoforme patologica, PrP^{Sc}. Tale trasformazione non implica una modificazione chimica e la sequenza degli aminoacidi è identica per le due isoforme, mentre la struttura

secondaria differisce nel contenuto ⁽⁴⁾ in Beta-avvolgimento (Fig 1). PrP^{Sc} risulta anche parzialmente resistente all'azione proteolitica ed è insolubile ai detergenti non denaturanti. La struttura terziaria è caratteristica per i prioni responsabili di differenti patologie. Studi condotti su animali transgenici rivelano che la PrP^{Sc} agisce da stampo sul quale la PrP^C si trasforma nella proteina patologica attraverso un processo mediato da una altra proteina, Proteina X ⁽⁵⁾, Fig.2.

Figura 1
Struttura secondaria di PrP

PERCENT	PrP ^C	PrP ^{Sc}	PrP27-30
ALFA HELIX	42	30	21
BETA SHEET	3	43	54

PNAS 90, 10962, 1993

Figura 2
Trasformazione PrP^C→PrP^{Sc}

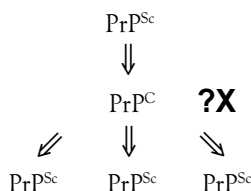


Figura 3
Proteina prionica (PrP) Isoforme

Codon	1	23	51	91	102	231	254
PrP ^C	209	AMINOACIDI (AA)					
PrP ^{Sc}	209	AMINOACIDI (AA)					
	PROTEOLYSI LIMITATA (K)						
PRIONE PrP 27-30	142						AMINOCIDI (AA)

From Prusiner S,B, Nobel Lecture, 1998. Univ. California
Ball H.L. Italfarmaco Research Centre, Milano, 1996
Ball H.L. Univ. California, 2001

Questo processo automante-mentesi ha come risultato un esponenziale incremento della PrP^{Sc} che si deposita essenzialmente nel cervello ma anche in altre zone.

La proteina polipeptidica prionica consiste in 254 aminoacidi (AA)-(Fig. 3) con 22 segnali di sequenza nella porzione N-terminale

e 23 nella C-terminale; le proteine prioniche mature sia normali che patologiche possiedono 209 AA. La maggiore modifica di conformazione che avviene nella fase di trasformazione da normale a patologica è essenzialmente localizzata in una regione confinante con gli AA 90 e 112. Il trattamento con l'enzima proteolitico (proteinas K) distrugge completamente la Prp^C, ma solo circa 67 AA sono digeriti nella porzione terminale di PrP^{Sc} (codificante per 142 AA del prione).

Il prione è stato evidenziato più di 20 anni fa in materiale patologico autoptico di pazienti deceduti; fu dichiarato Prp 27-30 in base al suo peso molecolare e alla massa di circa 15 picogrammi ($10^{9,0}$ /mg.); I prioni sono filtrabili come i virus^(6,7,8)

Le malattie sostenute dai prioni sono:

- A. di origine genetica per mutazione della PRNP (mutazione puntiforme, delezione, inserzione)
- B. di origine infettiva (ma non contagiosa); Trasmissione iatrogena, Nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jacob (vCJD)
- C. Sporadica; quest'ultima che è la più frequente è di eziologia sconosciuta e l'infezione da prione è sospettata ma non dimostrata^(9,10,11)

E' estremamente importante il fatto che i prioni sono tutti trasmissibili sia sperimentalmente che per via iatrogena.

Le malattie umane da prioni sono elencate nella *Tab1*.

Le malattie da prioni sono caratterizzate dal punto di vista istopatologico da una vacuolizzazione spongiforme interessante ogni parte della sostanza grigia, da una proliferazione degli astrociti e compromissione dei neuroni a causa della degenerazione e dall'accumulo di sostanza amiloide. Non vi sono segni di infiammazione e non si evidenziano anticorpi diversamente dalle tipiche encefaliti virali.

La sintomatologia della vCJD consiste in una progressiva demenza e in sintomi psichici negli stadi più precoci; in alcune forme l'atassia può essere presente talvolta in maniera dominante. La diagnosi viene confermata dall'autopsia.

Non è possibile testare l'infettività dei pazienti nella fase preclinica della malattia; ciò è anche vero per le forme subcliniche del bestiame (BSE)

La variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD)

L'interesse per i prioni è cresciuto nell'ultimo decennio a causa della descrizione di una nuova variante della CJD (vCJD) in Gran Bretagna nel 1996⁽¹³⁾. Il legame tra la encefalite spongiforme bovina (BSE) e la vCJD fu notato per la prima volta

da un giovane medico nel 1988 e dichiarato possibile e probabile dal governo britannico nel 1996.

La malattia fu detta variante per i differenti aspetti clinici (predominanza di sintomi psichiatrici) e per la giovane età dei colpiti (in media 28 anni con un caso di dodici anni).

Ciò può dipendere o dalla suscettibilità legata all'età dell'infezione, o da un abbreviamento del tempo di incubazione sempre legato all'età o dal rischio di maggiore esposizione nei giovani con più probabilità portati a mangiare cibo a rischio.

A tutto Settembre 2003 ⁽¹⁵⁾ sono stati descritti 143 casi della malattia in Gran Bretagna (*Tab. 2*), 6 in Francia ⁽¹⁶⁾, 2 in Italia ^(17,18) e uno rispettivamente in Irlanda del Nord, Hong-Kong ⁽¹⁹⁾ e Miami ⁽²⁰⁾ pur essendo gli ultimi due di provenienza britannica. Un caso di vCJD è stato trovato anche in Canada ⁽⁷⁰⁾.

Il futuro della vCID non è ben chiaro a causa del periodo di incubazione estremamente lungo (decadi) tanto che in alcuni casi può essere più lungo dell'aspettativa di vita.

Tavola 1
Encefalopatie spongiformi trasmissibili in campo umano

MALATTIA	ANORMALITA' GENETICHE
CJD/FAMILIARE GSS FFI	MUTAZIONI PUNTIIFORMI NEL CODONE PrP 102, 105, 117, 145, 160, 171, 178, 180, 183, 187, 188, 198, 200, 202, 208, 210, 212, 217, 232
CJD/SPORADICA /IATROGENA /VARIANTE FI /SPORADICA	NESSUNA NESSUNA NESSUNA NESSUNA
ALTRE	DELEZIONI TRA PrP 51-91 UN OCTAPEPTIDE (24bp) DUE OCTAPEPTIDI (48 bp)
	INSERZIONI TRA PrP 51-91 UNO, DUE, TRE, QUATTRO, CINQUE, SEI, SETTE, OTTO, NOVE, OCTAPEPTIDI

CJD MALATTIA DI CREUTZFELDT-JAKOB
GSS SINDROME DI GERSTMANN-STRAEUSSLER-SCHEINKER
FFI INSONNIA FAMILIARE FATALE
FI INSONNIA SPORADICA FAMILIARE

Tavola2**Dati della Gran Bretagna (CJD Surveillance Unit)**

<i>Morti</i>	
Morti di vCJD definitivamente confermata	101
Morti di probabile vCJD (senza conferma neuropatologica):	33
Morti di probabile vCJD (Conferma neuropatologica in corso):	3
Numero di morti di vCJD accertata o probabile	137
<i>In vita</i>	
Numero di casi confermati/probabili di vCJD ancora in vita	6
Totale dei casi	143

(Aggiornamento Ottobre 2003)

Si ritiene che cento milioni di europei siano infetti ⁽⁶⁶⁾ con il prione responsabile della BSE/vCJD.

Il legame BSE/vCJD è confermato da:

- analisi biochimica con western-blot dei prioni ⁽²¹⁾
- confronto degli aspetti neuropatologici e del periodo di incubazione dopo passaggi seriali su animali da laboratorio ⁽²²⁾
- esperimenti su animali transgenici mediante cross-infezioni con prioni animali ed umani ⁽²³⁾
- caratteristiche simili dei quadri clinici vCJD e BSE dopo infezione di primati ⁽²⁴⁾
- caratteristiche similari dei prioni vCJD e BSE mediante risonanza magnetica nucleare ⁽²⁵⁾

Tali studi sono costati un enorme lavoro e un notevole dispendio economico se si considera che una tipizzazione di un ceppo prionico ha il costo di due milioni di sterline britanniche

Inoltre anche l'interesse scientifico è significativamente aumentato e ciò è dimostrato dall'enorme numero di articoli scientifici sui prioni che sono 100 volte superiori a quelli di contenuto medico generale.

L'encefalopatia spongiforme bovina(BSE)

La BSE costituisce la malattia da prioni meglio conosciuta dopo l'identificazione in Gran Bretagna nel 1986 ⁽⁶⁹⁾

La BSE è esplosa in maniera epidemica e nel 2001 oltre 7.000 casi sono stati ⁽²⁶⁾ accertati solo in Gran Bretagna.

Sebbene oltre 2,5 milioni di capi di bestiame siano stati abbattuti per bloccare l'epidemia si calcola che 750.000 bovini infetti siano entrati nel circuito alimentare umano.

La malattia nel bestiame ha avuto origine per una alimentazione supplementare con carne e farina ossea di bovini e ovini contaminati dall'agente prionico; tali pericolose procedure sono state drasticamente ridotte sia diminuendo la temperatura che bloccando l'estrazione con solventi. Si è giunti rapidamente alla proibizione di usare la farina di osso e la sua utilizzazione è stata bloccata nel 1988. Tuttavia, l'esportazione di tale nutrimento è continuata per un certo tempo e molti casi di BSE si sono progressivamente diffusi nelle regioni occidentali europee ma non nelle orientali(probabilmente per impossibilità economica a pagare la farina Britannica),negli Emirati Arabi,nelle Isole Falkland,in Canada e recentemente in Giappone⁽²⁷⁾, dove l'uso della farina è stato permesso finì a poco tempo fa.

Anche l'Italia ha esportato tale tipo di farina in alcuni paesi tra cui anche la Slovenia.

Regioni prive di BSE sono gli Stati Uniti, il centro e sud America,l'Australia e alcune regioni asiatiche.

Il controllo della BSE del bestiame nella fase della macellazione non è veramente efficace perchè il test diagnostico in uso dà risultati falsamente negativi nella fase preclinica della malattia e lo stesso è vero per le infezioni umane. La decontaminazione dei prioni appare quindi di fondamentale importanza.

Decontaminazione dei prioni

E' noto da tempo che i prioni presentano una resistenza inconsueta ai disinfettanti e ai processi di sterilizzazione fisici e chimici comunemente usati per la decontaminazione degli agenti patogeni.⁽²⁹⁻³³⁾

Per tale motivo risulta anche difficile raggiungere una opinione comune su quali possano essere le migliori condizioni per tale decontaminazione.

Numerosi studi sono stati condotti ma essi non tengono conto delle procedure di utilizzazione degli strumenti in un ambiente clinico che sono critiche per una possibile trasmissione iatrogena dei prioni.

Un tempo di contatto di 5 minuti con tessuti infetti con prioni(sperimentalmente è stato usato cervello), è sufficiente a rendere l'acciaio un potente veicolo di infezione^(34,35)

L'infettività di filamenti di acciaio contaminati persiste a lungo particolarmente se è presente materiale proteico secco o trattato con disinfettanti fissanti le proteine come ad es. la formaldeide ⁽³⁶⁾; I prioni possono in questi casi rimanere fissati per anni.

Allo stato attuale delle conoscenze la strumentazione riutilizzabile usata in neurochirurgia, oculistica, otorinolaringoiatria (si rammenti il pericolo infettivo legato al tessuto linfatico e paralinfatico nel faringe e nella lingua), gli strumenti usati per anestesia, in gastroendoscopia (prioni sono stati trovati nell'intestino) e in chirurgia odontoiatrica, dovrebbero essere presi in considerazione.

Il Dipartimento di sanità pubblica britannico stima che la trasmissione con strumentazione può incrementare del 10% l'entità di una eventuale epidemia. Sono previsti settecento casi di vCJD (!) con tali sistemi di trasmissione prima che vengano intraprese misure concrete per eliminare tale via ⁽³⁷⁾.

Le misure per prevenire la cross-trasmissione dell'infezione da parte di strumentazione medica si sono basate sugli studi di infettività dei prioni dopo inoculazione di animali (specialmente topi) per via intracerebrale prima e dopo le procedure sperimentali di decontaminazione.

Il titolo infettivo del materiale inoculato negli animali variava generalmente tra $10^{-8,0}$ e $10^{-10,0}$. Il grado di efficacia dopo il processo di decontaminazione era valutato in base alla diminuzione del titolo infettante ⁽³⁸⁾.

Si è dimostrato che un processo di prima deontaminazione che porti a una riduzione di 7 log del titolo infettivo e di un log nei successivi cicli di decontaminazione, può avere come possibile conseguenza un ulteriore numero di casi variabile tra 1,5 e 4 per 1000 infezioni primarie. Se la riduzione del titolo infettivo è inferiore (5 e 1 log) si possono attendere da 3 a 11 casi aggiuntivi per 100 infezioni primarie ⁽⁶⁵⁾.

Tutti questi tests sono stati veramente molto indaginosi e solo pochi laboratori sono in grado di effettuarli.

Sono state pubblicate numerose tecniche e procedure per la disinfezione e la sterilizzazione di strumenti potenzialmente contaminati da prioni. (Organizzazione Mondiale della Sanità ⁽³⁹⁾, Comitato Scientifico di esperti della Commissione Europea⁽⁴⁰⁾, la Food and Drug Administration degli USA, il Center for Disease Control / National Center for Infectious Diseases degli Usa ⁽⁴¹⁾, l'American Association of Neurology ⁽⁴²⁾, l'American Association of Microbiology ⁽⁴³⁾, Pharmaceutical

Regulation Affairs⁽⁴⁴⁾, l'Association for Professional in Infection Control-APIC,⁽⁴⁵⁾ Dipartimenti di Sanità di numerosi stati europei etc.)

E' interessante tra l'altro notare che le proposte del Swiss Health Department⁽⁴⁶⁾ per la decontaminazione dei prioni, corrispondono a quelle inglesi pubblicate nel 1984 (!).

Esiste una lunga serie di sostanze chimiche testate per il loro potere decontaminante; tale lista include praticamente tutti i disinfettanti noti finora e quindi non viene qui riportata. Molte di queste sostanze chimiche diminuiscono il titolo infettante dei prioni (generalmente tra $10^{8,00}$ e $10^{10,00}$) da uno a 5 logaritmi, **ma nessuna è risultata realmente efficace.**

Solo due sostanze chimiche NaOCL e NaOH hanno dimostrato efficacia ma recenti studi hanno dato risultati contrastanti dimostrando l'efficacia decontaminante solo se in combinazione con l'uso dell'autoclave.

La soluzione di NaOCL (usata normalmente alla concentrazione al 20.000 ppm) rilascia continuamente cloro e deve essere accuratamente sigillata e al riparo dalla luce.

I vapori di cloro che si liberano possono creare irritazione respiratoria e vi è necessità di usare la soluzione decontaminante in ambienti isolati e ben ventilati. NaOCL non corrode vetri o oggetti di alluminio ma è corrosivo invece sia per acciaio e per gli autoclavi nei quali non può essere usato per immergere gli strumenti

La soluzione di NaOH è più facile da usare. Essa deve essere preparata fresca prima dell'uso come soluzione 1N (40 g NaOH/litro di acqua) o inferiore⁽⁴⁸⁾.

Essa non corrode l'acciaio tranne rare eccezioni ma è corrosiva per vetro e alluminio. NaOH può essere usato per immergere gli strumenti in contenitori di acciaio o polipropilene; 30 minuti in autoclave sono più che sufficienti e la temperatura usualmente è di 121°C.

In definitiva la combinazione autoclave +NaOH sembra costituire il più efficace sistema di decontaminazione dei prioni⁽⁴⁹⁻⁵⁷⁾.

Non è rilevante se gli strumenti sono trattati con NaOH prima dell'azione dell'autoclave. Il risultato dell'azione combinata autoclave+NaOH fin dal 1988(!) è stato sempre soddisfacente anche con concentrazioni di NaOH ridotte fino a 0,1N.

La maggior parte degli esperimenti sulla decontaminazione dei prioni, in particolare mediante l'azione dell'autoclave, sono stati condotti da David N. Taylor (con ceppi prionici scrapie, BSE, e CJD).

Essi hanno dimostrato anche che nei moderni autoclavi le temperature di autoclave di 132°C-136°C raccomandate in molti paesi, sono, in certe circostanze non sicure⁽⁵⁸⁾, entrando in gioco numerosi fattori (integrità dei tessuti, tessuti macerati o in sospensione, fissaggio di materiale proteico con la temperatura, la pressione negativa o la presenza di sostanze chimiche)

Ciò da luogo a una sottopopolazione resistente^(59,60) che non può più essere successivamente decontaminata anche con temperature di autoclave di 138°C.

Il metodo di sanificazione di strumenti contaminati proposto dall'OMS⁽³⁹⁾ include (1) la decontaminazione con NaOH o NaOCL per 30 o 60 minuti seguita da sterilizzazione in autoclavi GL(Gravity load) a 121°C per 30 minuti,(2) lavaggio e (3) PL-autoclavaggio di routine a 134°C.

Ciò è assolutamente corretto ma i più moderni ospedali non sono dotati di GL-Autoclavi perchè essi sono stati sostituiti con i tipi PL.

I moderni Autoclavi PL ad alto vuoto non sono adatti per la decontaminazione dei prioni perchè la camera dove si crea il vuoto è rapidamente riempita con vapore con un rapido aumento della temperatura delle superfici.

Negli autoclavi GL la temperatura aumenta con minore progressività e il rischio di fissaggio delle proteine è ridotto.

Inoltre la maggior parte degli operatori addetti preferisce una fase di pulizia prima del processo di decontaminazione, ma in questo caso il materiale usato per la pulizia deve essere trattato come rifiuto infetto e anche la zona di lavaggio⁽³⁹⁾ deve essere decontaminata(!)

Gli autoclavi in grado di decontaminare con sicurezza i prioni sono disponibili da parte dell'industria Fedegari.

L'autoclave a camera verticale ha un diametro di 40 cm e una profondità di 60 cm. E' stato costruito specificamente per la decontaminazione ed è regolato completamente in maniera elettronica. Intenzionalmente non vi è pompa per vuoto e l'aria interna alla camera non viene espulsa, di conseguenza la miscela aria vapore che si forma viene mantenuta in maniera omogenea con l'ausilio di un ventilatore, connesso ad un magnete che è installato sotto il coperchio dell'autoclave, escludendosi così anche la sua fuoriuscita.

In questo modo non vi è pericolo di contaminazione per il personale. La struttura dell'autoclave è particolarmente robusta perchè la temperatura può arrivare a 141°C e la pressione del vapore fino a 5,7 bar durante il ciclo di contaminazione

(la pressione del vapore a 141°C è di 3,70 bar e la pressione parziale dell'aria, scaldata a 141°C è di 1,50 bar; la pressione totale è quindi di 5,20 bar; I restanti 0,50 bar costituiscono un margine di sicurezza). La condensa che si forma durante il ciclo così come quella che si forma all'inizio del processo rimangono nella camera dell'autoclave fino al ritorno alla temperatura ambiente.

L'autoclave descritto può essere usato per due tipi di decontaminazione:

- A) vapore/calore a 134°C per 18 minuti, metodo OMS 6,⁽³⁹⁾ o con temperature più alte fino a 141°C
- B) Vapore/calore a 121°C combinato con l'azione di NaOH 1N-Metodo OMS 1-3,⁽³⁹⁾
- C) Con più bassi livelli di concentrazione di NaOH e di temperatura (ad es. bollitura per 10 minuti)⁽⁶⁴⁾

Il sistema B risulta considerevolmente più efficace data la possibilità dell'azione simultanea che l'autoclave offre.

Lo strumentario da decontaminare deve essere immerso in appositi containers (disponibili insieme all'autoclave), riempiti con la soluzione di NaOH (metodo B) o con acqua e detersivi (metodo A)

Gli strumenti devono essere lavati dopo la decontaminazione (NaOH migliora la pulizia) e successivamente sterilizzati secondo le disposizioni internazionali (Europa 18 minuti a 134°C), USA 60-90 minuti a 132°C-134°C).

Per quanto riguarda l'eventuale danneggiamento degli strumenti con l'uso del metodo NaOH in ambiente ospedaliero, occorre far presente che gli strumenti devono anche essere saggiati per la loro compatibilità con l'NaOH.

Un altro aspetto da considerare è che in ogni caso è noto che alcuni dispositivi medici non possono essere decontaminati col calore nè con sostanze chimiche in quanto praticamente tutti i disinfettanti usati per decontaminare I prioni non hanno dato risultato.

Il solo sistema veramente efficace per prevenire la trasmissione iatrogena è l'uso di strumenti monouso. I dispositivi a perdere da usare per anestesia o per tonsillectomia sono stati introdotti nel 2001⁽⁶²⁾ e già da 15 anni i dispositivi a perdere per intubazione tracheale sono disponibili, anche se tuttavia spesso i laringoscopi erano riusati per altri pazienti. Occorre ricordare che il tessuto linforeticolare dell'orofaringe è talmente infettivo ($> 10^6 \text{ID}_{50} \text{g}^{-1}$) che la decisione di usare materiale a perdere è assolutamente giustificata.

D'altra parte subito dopo l'introduzione di tale materiale sono cominciati a pervenire alla Medical Device Agency segnalazioni crescenti di incidenti avversi a volte gravi con complicazioni che sono andate consistentemente aumentando

Sembra quindi necessario proporre una revisione dell'uso di dispositivi per anestesia solo a perdere per le procedure di tonsillectomia.: d'altra parte i medici chirurghi inglesi in definitiva non ritengono che i processi di pulizia e di sterilizzazione normalmente in uso abbiano ridotto il rischio iatrogeno nella stessa misura con cui si riduce utilizzando strumenti a perdere il cui rischio è probabilmente non maggiore del rischio d'uso di strumenti riutilizzati adeguatamente sanati con adeguati controlli di qualità e il cui prezzo è piccolo in confronto al grande rischio che viene prevenuto.

Il problema della decontaminazione dei prioni si fa più importante col passare del tempo perchè si ritiene: A. che circa 100 milioni di Europei siano probabilmente infetti con i prioni BSE vCJD ⁽⁶⁶⁾; tali soggetti rimarranno a rischio per i prossimi 40-50 anni per il prolungato periodo di incubazione; B. è possibile che fino al 35% delle continuamente crescenti sporadiche CJD (in Svizzera 200%), derivino da interventi medici ^(67,68); C. la CJD non è una malattia ma una sindrome con differenti forme patologiche (v.tab I); D. alcune mutazioni genetiche, sebbene clinicamente inapparenti, sono presenti in circa il 2% della popolazione.

Avendo questo in mente appare evidente che non si fa ancora abbastanza per evitare la trasmissione iatrogena dei prioni.

Bibliografia

1. Alper T., Cramp W.A., Haig D.A. and Clarke M.C. *Does agent of scrapie replicate without nucleic acid?* Nature 214, 764-755, 1967
2. Prusiner S.B. Prions. *Nobel Lecture Pro.Natl.Acad.Sci.(USA)*, 95, 13363-13383, 1998
3. Oesch B., Westaway D., Wälchli M., McKinley M.O., Stephen B., Kent H., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E., Prusiner S.B. and Weissmann C. *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.* Cell 40, 735-746, 1985
4. Pan K-M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fletterick R.J., Cohen F.E. and Prusiner S.B. *Conversion of α -helices into beta-sheet features in the formation of the scrapie prion proteins.* Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 90, 10962-10966, 1993
5. Telling G.C., Scott M., Mastrianni G., Gabiton R., Torchia M., Cohen F.E., DeArmond S.J. and Prusiner S.B. *Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein.* Cell 83, 79-90, 1995
6. Ball H.L. and Mascagni P. *Chemical synthesis and purification of proteins: A methodology* Int. J. Peptide Protein Res. 48, 31-47, 1996
7. Ball H.L., King D.S., Cohen F.E., Prusiner S.B. and Baidwil M.A. *Engineering the prion protein using chemical synthesis.* J. Peptide Res. 58, 357-374, 2001
8. Prusiner S.B. *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.* Science 216, 136-144, 1982
9. Butler D. *Prion data suggest BSE link to sporadic CJD.* Nature 420, 450-450, 2002
10. Asante E.A., Linehan J.M., Desbruslais M., Joiner S., Gowland I., Wood L., Weich J., Hill A.F., Lloyd S.E., Wadsworth D.F. and Collinge J. *Bse prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein.* EMBO J. 21, 6358-6386, 2002
11. Glatzel M., Rogivue C., Ghani A., Streffer J.R., Amsier L. and Aguzzi A. *Incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in Switzerland.* Lancet 360, 139-141, 2002
12. Muench K.H. *Genetic Medicine.* Gene structure, page 9. Elsevier, 1988
13. Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A. and Smith P.G. *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.* Lancet 347, 921-925, 1996
14. Holt t.A. and Phillips J. *Bovine spongiform encephalopathy.* Brit.Med. J., 296, 1581-1583, 1988
15. Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), Surveillance Unit, Edinburgh, UK
16. Laplanche J.L., Lepage K., Péc'h K., Delasnerie-Lauprêtre D. and Charron D. *HLA in French patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease.* Lancet 361, 531-532, 2003
17. LaBella V., Collinge J., Pocchiari M. and Piccoli F. *Variant Creutzfeldt-Jakob disease in a Italian woman.* Lancet 360, 997-998, 2002
18. ANON. *Two vCJD cases in Italy.* Schweiz. Bundesamt für Gesundheit. Nosocomial Infections, December 2002
19. Kay R., Lau W.Y., Ng H.G., Chan Y.L., Lyon D.J. and Hasselt C.A. *Variant Creutzfeldt-Jakob disease in Hong Kong.* Hong Kong Med. 7, 296-298, 2001
20. Wiersma S., Cooper S., Knight P., Kennedy A.M., Joiner S. and Belay E. *Probable variant Creutzfeldt-Jakob disease in a U.S. resident-Florida.* M.M.W.R. 51, 927-929, 2002

21. Jansen G.H., Voll C.L., Robinson C.A., Gervais R., Sutcliffe T., Bergeron C., Coulthart M.B. and Giulivi A. *First case of variant Creutzfeldt-Jakob disease in Canada*. *Can. Commun. Dis. Rep.* 29, 117-120, 2003
22. Aguzzi A. *Der Prionen Jäger*. *Blick* 12. Nov. 2001
23. Collinge J., Sidle K.C.L., Meads J., Ironside J. and Hill A.F. *Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD*. *Nature* 383, 685-690, 1996
24. Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCordie L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H. and Bostock C.J. *Transmission to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent*. *Nature* 389, 498-501, 1997
25. Scott M.R., Will R., Ironside J., Nguyen H.O., Tremblay P., DeArmond S.J. and Prusiner S.B. *Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 96, 15137-15142, 1999
26. Lasmez C.I., Fournier J.G., Nouvel V., Boe H., Marce D., Lamoury F. and Deslys J-P. *Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health*. *J. Natl.Acad.Sci. (USA)* 98, 4142-4147, 2001
27. López F., Zahn R., Riek R. and Wüthrich K. *NMR structure of the bovine prion protein*. *Proc.Natl.Acad.Sci. (USA)* 97, 8334-8339, 2000
28. Ghani A.C., Donnelly C.A., Ferguson N.M. and Anderson R.M. *The transmission dynamics of BSE and vCJD*. *C.R. Biologies* 325, 37-47, 2002
29. Editorial. *Japan's beef scandal*. *Nature* 413, 333-333, 2001
30. Anonymous. *For the want of a test*. *Nature* 409, 649-649, 2001
31. Hartley E.G. *Action on disinfectants on experimental mouse scrapie*. *Nature* 213, 1135-1135, 1967
32. Dickinson A.G. and Taylor D.M. *Resistance of scrapie agent to decontamination*. *New Engl. J.Med.* 229, 1413-1414, 1978
33. Brown P., Gibbs C.J.Jr., Amyx H.L., Kingsbury D.T., Sulima M.P. and Gajdusek D.C. *New Engl. J.Med.* 306, 1279-1282, 1982
34. Kimberlin R.H., Walker C.A., Millson G.C., Taylor D.M., Robertson P.A., Tomlinson A.H. and Dickinson A.G. *Disinfection studies with two strains of mouse passaged scrapie agent*. *J.Neurol.Sci.* 59, 355-369, 1983
35. Brown P., Rohwer R.G. and Gajdusek D.C. *Newer data on the inactivation of scrapie virus of CJD virus in brain tissue*. *J. Infect. Dis.* 153, 1145-1148, 1986
36. Zobeley E., Flechsig E., Cozzio A., Enari M. and Weissmann C. *Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface*. *Mol.Med.* 5, 240-243, 1999
37. Flechsig E., Hegyl I., Enari M., Schwarz P., Collinge J. and Weissmann C. *Mol. Med.* 7, 679-684, 2001
38. Taylor D.M. and McConnell J. *Autoclaving does not decontaminate formol-fixed scrapie tissue*. *Lancet* i, 1463-1464, 1988
39. Johnson A., *Why we should be using disposable instruments for tonsillectomy*. *Ent. Newa* 11, 53-53, 2003
40. Rutala W.A. and Weber D.J. *Creutzfeldt-Jakob disease: Recommendations for disinfection and sterilization*. *Clin. Infect.Dis.* 32, 1348-1356, 2001

41. Jepsen O.B. Infection control: Preventing iatrogenic transmission of spongiform encephalopathy in Danish hospitals. *APMIS* 110, 104-112, 2002
42. WHO Infection Control Guidelines for Transmissible Spongiform Encephalopathies. Report of a WHO consultation, Geneva Switzerland, 23-26 March 1999
43. Vossen P. Scientific advice in support to risk management with regard to BSE. Verh. K.Acad. Geneesk. Belg. 63, 379-403, 2001
44. Anonimous. Bovine Spongiform Encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob disease. Center for Disease Control and Prevention; National Center for Infectious Diseases; US Dept. of Health and Human Services. May 21, 2003
45. American Association of Neurology. Precautions in handling tissues, fluids, and other contaminated materials from patients with documented or suspected CJD. *Ann. Neurol.* 19, 75-77, 1986
46. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease. Manual of Clinical Microbiology 8th Ed. pp. 100-101, 2003
47. Matthews B. BSE/TSE risks associated with active pharmaceutical ingredients and starting materials. The situation in Europe and the global implications for healthcare manufacturers. *PDA J. Pharm. Science Techn.* 55, 295-328, 2001
48. Martin M.A. and Reicheiderfer M. APIC guidelines for infection prevention and control of flexible endoscopy. *Am. J. Infect. Control* 22, 19-38, 1994
49. Schweizerische Bundesrat. Verordnung über die Prävention der Creutzfeldt-Jakob Krankheit bei chirurgischen und medizinischen Eingriffen. Januar 2003.
50. Tateishi J., Tashima T. and Kitamoto T. Inactivation of the CJD agent. *Ann. Neurol.* 24, 466-466, 1988
51. Brown P., Rohwer R.G. and Gajdusek D.C. Sodium decontamination of CJD virus. *New Engl. J. Med.* 310, 727-727, 1984
52. Brown P., Rohwer R.G., Green E.M. and Gajdusek D.C. Effects of chemicals, heat, and histopathologic processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus. *J. Infect. Dis.* 145, 683-687, 1982
53. Taylor D.M. Decontamination of Creutzfeldt-Jakob agent. *Ann. Neurol.* 20, 749-749, 1986
54. Taylor D.M. Autoclaving standards for CJD agent. *Ann. Neurol.* 22, 557-558, 1987
55. Tamai Y., Taguchi F. and Miura S. Inactivation of the CJD agent. *Ann. Neurol.* 24, 466-467, 1988
56. Taguchi F., Tamai Y., Uchida K., Kitajima R., Kojima H., Kawaguchi T., Ohtani Y. and Miura S. Proposal for a procedure for complete inactivation of the CJD agent. *Arch. Virol.* 119, 297-301, 1991
57. Ernst D.R. and Race R.F. Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *J. Virol. Methods* 41, 193-202, 1993
58. Taylor D.M., Fernie K. and McConnell I. Inactivation of the 22A strain of scrapie agent by autoclaving in sodium hydroxyde. *Vet. Microbiol.* 58, 87-91, 1997
59. Taylor D.M. Inactivation of prions by physical and chemical means. *J. Hostp. Infect.* 43 (Suppl) 569-576, 1999
60. Taylor D.M. Inactivation of the BSE agent. *C.R.Acad.Sci.III* 325, 75-76, 2002
61. Taylor D.M. and Bell J.E. Prevention of iatrogenic transmission of CJD. *Lancet* 341, 1543-1544, 1992

62. Rowver R.G. *Virus-like sensitivity of the scrapie agent to heat inactivation*. *Science* 223, 600-602, 1984
63. Taylor D.M., Fernie E., McConnell I. and Steele P.J. *Observations on thermostabile subpopulations of the unconventional agents taht cause transmissible degenerative encephalopathies*. *Vet. Microbiol.* 64, 33-38, 1998
64. Jung M. *New steam sterilization. High pathogen safety autoclave (HPS)* *Infect. Glasnik (Zagreb)* 22, 119-122, 2002
65. Taylor D.M. *Boiling in sodium hydroxide inactivates mouse-passaged BSE agent*. Association of veterinary teachers and research workers. Current Topics in Veterinary Science 1999. 53th Annual Scarborough Meeting, 29-31. March 1999
66. Brown S.A. and Merritt K. *Use of containment pans and lids for autoclaving caustic solutions*. *Am. J. Infect. Control* 31, 257-260, 2003
67. Esler M.D., Baines L.C., Wilkinson D.J. and Langford R.M. *Decontamination of laryngoscopes: a survey of national practice*. *Anaesthesia* 54, 587-590, 1999
68. Blunt M.C. and Burchett K.R. Editorial I. *Variant Creutzfeldt-Jakob disease and disposable anaesthetic equipment - balancing the risk*. *Br. J. Anaesth.* 90, 1-3, 2003
69. Ward H.J.T., Everington D., Croes E.A., Alperovitch A., Delasnerie-Lauprêtre N., Zerr I., Poser S. and Duijn van C.M. *Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and surgery*. *Neurology* 59, 543-548, 2002
70. Mastrianni J. and Roos R.P. *Out, damned spot! out, I say. Issues related to prion decontamination*. *Neurology* 59, 488-489, 2002

(*) *Point mutations are the change in ONE nucleotide base pair (bp) in the complete human genome off 7x10⁹ bp in each diploid cell (12).*

Referente: M.J Jung

CH-8800 THALWIL/SVIZZERA SÄUMERSTRASSE 45 (FOR REPRINTS)

Editoriale

A. Panà, A. Muzzi Definire ed accertare i rischi per la salute.....	273
---	-----

Parte Scientifica e Pratica

E. Vecchi, E. Righi, L. Cavazzuti, M. Bicocchi, G. Aggazzotti Analisi di un'area omogenea nell'Azienda ospedaliera policlinico di Modena utilizzando i Diagnosis Related Groups (DRG).....	277
M. Panella, M. Renna, M.L. De Marchi, M. Luparia, S. Marchisio, D. Sarasino, G. Bornacina, G. Leigheb, M. Minola Appropriatezza delle richieste di consulenza dermatologica in Pronto Soccorso in una Azienda Ospedaliera piemontese	288
S. Tabolli, C. Renzi, A. Ianni, U.L. Aparo, A. Giordano Ricoveri "a rischio di inappropriatelyzza" e valutazione dell'efficienza tecnica	305
G. Sansebastiano, R. Zoni, L. Bigliardi, E. Ghirardi, N. Losio Studio comparativo sulle cinetiche d'inattivazione dell'HAV e del Poliovirus 2 con acido peracetico. Nota I.....	319

Note di Approfondimento

MJ. Jung, D. Pistolesi and A. Panà Prions, priondiseases and decontamination	331
--	-----

Note di Aggiornamento

C. Signorelli, E. Colzani, M. Fanti, E. Sacconi Valutazione dell'efficacia degli interventi in Sanità Pubblica: il ruolo dell'epidemiologia.....	345
--	-----