

# **PRESIDENZA DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI**

Comitato Nazionale per la Biosicurezza e le Biotecnologie

## **Gruppo di Lavoro sugli Xenotrapianti**

### **LINEE GUIDA PER LA SPERIMENTAZIONE CLINICA DEGLI XENOTRAPIANTI**

(DPCM-SG n. 30009 del 19 luglio 1999)

#### **Presidente**

**Prof. Leonardo Santi**

#### **Coordinatori**

**Prof. Giovanni Battista Ferrara, Prof.ssa Aurelia Sargentini**

#### **Componenti**

**Prof. Ermanno Ancona, Dott. Ferruccio Bonino, Prof. Carlo Umberto Casciani, Prof. Emilio Sergio Curtoni, Prof. Ignazio Roberto Marino, Prof. Franco Mosca, Prof. Riccardo Poli, Dott. Rodolfo Quarto, Prof. Giuseppe Remuzzi, Prof. Lorenzo Silengo, Prof. Gerolamo Sirchia, Prof. Alberto Giovanni Ugazio, Dott. Bruno Valente, Prof. Claudio Viscoli**

#### **Esperti aggregati**

**Dr. Paolo Bruzzi, Prof. Eraldo Seren, Dr.ssa Maria Tollis, Dr. Mario Venditti**

#### **Ufficio di Segreteria**

**Prof. Mario Bebi, Dott.ssa Alessandra Cifani**

*15 Dicembre 2000*

## SOMMARIO

<b>1. INTRODUZIONE</b>	Pag. 4
<b>2. CONSIDERAZIONI GENERALI</b>	Pag. 6
2.1 Alternative allo xenotrapianto	Pag. 6
2.2 Disporre della vita di animali per eseguire trapianti nell'uomo	Pag. 6
2.3 Probabilità attuali di successo di uno xenotrapianto nell'uomo	Pag. 7
2.4 Rischio di trasmissione di malattie infettive dall'animale all'uomo	Pag. 8
2.4.1 Rischi per il paziente.	Pag. 8
2.4.2 Rischi per la popolazione.	Pag. 8
2.5 Accettabilità psicologica da parte di un paziente di un trapianto con organo animale	Pag. 9
2.6 Accettabilità da parte dell'opinione pubblica del concetto di trapianti da animali a uomini	Pag. 9
<b>3. STUDI CLINICI SPERIMENTALI</b>	Pag. 10
3.1 Condizioni essenziali per procedere alla sperimentazione dello xenotrapianto sull'uomo.	Pag. 10
3.2 Requisiti per la sperimentazione clinica dello xenotrapianto	Pag. 10
3.3 Requisiti dei centri di sperimentazione	Pag. 10
3.4 Modalità operative della biovigilanza	Pag. 11
3.5 Consenso informato dei pazienti candidati.	Pag. 11
3.6 Monitoraggio dei sanitari	Pag. 12
3.7 Registri dello xenotrapianto	Pag. 12
3.8 Collegamento internazionale dei registri per lo xenotrapianto	Pag. 13
<b>4. CERTIFICAZIONE DI ANIMALI E ALLEVAMENTI</b>	Pag. 14
4.1 Introduzione	Pag. 14
4.1.1. Obiettivi e principi	Pag. 14
4.1.2. Aspetti procedurali	Pag. 14
4.2 Adempimenti normativi e certificazioni relativi a:	Pag. 15
4.2.1 Benessere animale	Pag. 15
4.2.2 Utilizzo di animali geneticamente modificati	Pag. 16
4.2.3 Applicazione delle norme di sicurezza	Pag. 16
4.2.4 Applicazioni di norme specifiche riguardanti la legislazione veterinaria relativa all'impiego di farmaci, prodotti immunizzanti, additivi per gli alimenti da destinare agli animali	Pag. 16
4.2.5 Norme di rilascio di specifiche autorizzazioni e accreditamento delle strutture (es. Relative alla conformità alle buone pratiche di Laboratorio, ai sensi del d.l. 120/92)	Pag. 16
4.2.6 Svolgimento di visite e controlli ispettivi periodici da parte delle Autorità competenti (ai sensi del disposto precedente).	Pag. 16
4.2.7 Adempimenti di carattere amministrativo	Pag. 16
4.3 Procedure operative standard (pos) e protocolli operativi (po)	Pag. 16
4.4 Acquisizione e archiviazione di documenti e campioni – identificazione degli animali	Pag. 18
4.5 Aspetti tecnici	Pag. 19
4.5.1 Criteri per la selezione degli animali donatori	Pag. 19
4.5.2 Requisiti	Pag. 20
4.6 Caratteristiche di progettazione della struttura	Pag. 21
4.7 Struttura gestionale dell'impianto	Pag. 22
4.8 Programmi di sorveglianza e monitoraggio dello stato sanitario	Pag. 24
4.9 Criteri per il depistaggio nei confronti di agenti infettivi noti	Pag. 25
4.10 Tabella	
<b>5. RICERCHE DI BASE</b>	Pag. 28

5.1 Introduzione	Pag. 28
5.2 Accreditalamento delle strutture e notifica di attivit�	Pag. 28
5.2.1 Identificazione dei responsabili della struttura	Pag. 28
5.2.2 Caratteristiche dei locali e delle attrezzature per la manipolazione delle cellule e dei tessuti	Pag. 29
5.2.3 Caratteristiche dei locali e delle attrezzature per il prelievo e/o l'utilizzo delle cellule e dei tessuti	Pag. 30
5.2.4 Identificazione dell'ente ispettore e di quello accreditante	Pag. 30
5.2.5 Notifiche per le strutture che effettuano manipolazioni in vitro	Pag. 30
5.3 Controllo di qualit�	Pag. 30
5.3.1 Criteri generali	Pag. 30
5.3.2 Controllo di qualit� del processo produttivo	Pag. 31
5.3.3 Coltura, espansione e/o ingegnerizzazione delle cellule in vitro.	Pag. 31
5.3.4 Controllo di qualit� del prodotto	Pag. 31
5.3.5 Crioconservazione	Pag. 33
5.3.6 Banche per la conservazione di cellule e tessuti	Pag. 34
5.4 Origine dei materiali	Pag. 34
5.4.1 Origine dei materiali da utilizzare per colture cellulari	Pag. 34
5.4.2 Origine di tutti gli altri reagenti	Pag. 34
5.4.3 Tecnica di prelievo e trasporto	Pag. 34
<b>6. PROPOSTE OPERATIVE</b>	Pag. 35
<b>7. COMMISSIONE XENOTRAPIANTI</b>	Pag. 35
<b>8. REGISTRO CENTRALIZZATO XENOTRAPIANTI</b>	Pag. 36
<b>9. BIO-BANCA CENTRALIZZATA XENOTRAPIANTI</b>	Pag. 36
<b>10. MONITORAGGIO SANITARIO E QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE PROFESSIONALMENTE ESPOSTO AL RISCHIO DELLO XENOTRAPIANTO</b>	Pag. 37

## **PRESENTAZIONE**

I progressi raggiunti nella comprensione dei meccanismi immunitari che sono alla base del rigetto di organi trapiantati tra individui di specie diverse, associati all'avvento dell'ingegneria genetica ed alla produzione di animali transgenici, lasciano intravedere la possibilità che lo xenotrapianto possa presto diventare una opzione terapeutica per molti malati con insufficienza d'organo terminale.

Lo xenotrapianto rappresenta, tuttavia, un approccio terapeutico interamente nuovo in campo biomedico e solleva problematiche particolari di ordine clinico, etico, procedurale, legislativo e di biosicurezza mai affrontate in precedenza.

Questo documento, redatto dal Gruppo di lavoro sugli Xenotrapianti, costituito da questo Comitato con decreto della Presidenza del Consiglio dei Ministri, ed approvato il 15 dicembre 2000, indica alcune linee guida per la sperimentazione clinica degli xenotrapianti.

Accanto a considerazioni di ordine generale sullo xenotrapianto, queste linee guida definiscono in modo dettagliato i criteri tecnico-scientifici nonché gli aspetti etici, normativi ed organizzativi entro i quali dovrebbe essere condotta qualsiasi sperimentazione clinica degli xenotrapianti in Italia. Lo xenotrapianto è un settore scientifico in continua evoluzione ed è pertanto probabile che queste linee guida andranno incontro ad aggiornamento periodico che terrà conto dello stato delle conoscenze in materia.

Ferma restando la volontà del Gruppo di lavoro di aderire alle raccomandazioni del Consiglio d'Europa sullo xenotrapianto, sono convinto che queste linee guida rappresentino una tappa fondamentale per una sperimentazione rigorosa e controllata di questo nuovo approccio terapeutico in Italia, per permettere allo xenotrapianto di divenire presto una realtà clinica sicura.

Leonardo Santi  
Presidente del CNBB

## INTRODUZIONE

Gli allotrapianti, grazie ai progressi nel campo dell'immunogenetica e della terapia immunosoppressiva, rappresentano ormai la scelta primaria nel trattamento di malattie caratterizzate da insufficienza d'organo all'ultimo stadio. Tuttavia la maggior limitazione agli allotrapianti rimane la scarsa disponibilità di organi a fronte di un crescente numero di pazienti potenzialmente candidati al trapianto. Per questo motivo si è affermato tra i ricercatori un rinnovato interesse alla possibilità di utilizzare organi di altre specie nei trapianti sull'uomo.

Con il termine "Xenotrapianto" si intende qualsiasi procedura che implichi il trapianto, l'impianto o la perfusione, a scopo terapeutico, in un ricevente umano di: a) fluidi, cellule, tessuti od organi provenienti dal corpo umano che hanno avuto un contatto *ex vivo* con cellule, tessuti od organi di origine animale (non umani), è inclusa pertanto la procedura clinica del fegato bioartificiale; b) cellule e/o tessuti xenogenici, cioè di origine animale (non umani), anche se espansi "in vitro" o sottoposti a "manipolazione" minima. Per "manipolazione minima" si intendono le manipolazioni che non portano ad un'attivazione delle cellule e/o ad una stimolazione della proliferazione cellulare (Es. taglio, modificazione della forma, criopreservazione, sterilizzazione mediante radiazioni gamma, centrifugazione e trattamento con antibiotici). Analogamente sono considerate "manipolazioni minime" l'estrazione o la separazione di cellule da un tessuto se questo non altera le caratteristiche principali delle cellule e del tessuto dal quale le cellule sono state estratte o separate.

Le barriere di compatibilità allo xenotrapianto, sembravano fino a pochi anni fa invalicabili. Oggi i notevoli progressi sulla comprensione delle basi molecolari e dei meccanismi coinvolti nel rigetto di xenotrapianto, rendono ipotizzabile l'applicazione di questa tecnica che fornirebbe una sorgente pressoché illimitata di organi.

Gli studi clinici sperimentali condotti sinora, e probabilmente prematuri, pongono una serie di problemi a carattere non solo scientifico. I primati non umani, come lo scimpanzé e il babbuino, che sono gli animali più correlati geneticamente all'uomo, non rappresentano una scelta d'elezione per i rischi di trasmissioni all'uomo di infezioni, per la scarsa disponibilità, per il costo degli animali e per le numerose implicazioni etiche. Pertanto la ricerca si è concentrata su altre specie più discordanti geneticamente come il maiale ed i progressi ottenuti nella comprensione dei meccanismi coinvolti nel rigetto di xenotrapianti aprono la prospettiva ad una futura utilizzazione clinica di organi porcini. Nel 1997 sono stati riportati parziali successi di trapianto di neuroni fetali porcini nel cervello di pazienti con morbo di Parkinson. Inoltre, al fine di vicariare temporaneamente alcune delle funzioni epatiche nell'attesa di allotrapianto, la "Food and Drug Administration" ha recentemente approvato negli Stati Uniti un protocollo basato sulla perfusione extracorporea con sangue di pazienti con insufficienza epatica terminale di cellule epatiche porcine intrappolate in un bioreattore. Sono inoltre state autorizzate perfusioni *ex vivo* con fegato di maiale intero. Anche in Italia sono stati autorizzati alcuni centri per sperimentazione clinica del fegato bioartificiale.

Bisogna tuttavia tenere conto che lo xenotrapianto d'organo e l'impianto di cellule e tessuti non umani violano le barriere che si sono sviluppate tra specie diverse nei millenni e perciò, se da una parte possono generare indubbi benefici individuali, dall'altra potrebbero creare potenziali rischi per la comunità. Infatti, patogeni non umani o retrovirus endogeni di altre specie potrebbero svilupparsi ed adattarsi alla specie umana in condizioni di facilitazione quali quelle di una marcata immunosoppressione. Pertanto nuovi patogeni derivati dagli organismi animali potrebbero causare sindromi cliniche difficilmente diagnosticabili, tenendo conto che per molti microrganismi di origine animale mancano test laboratoristici specifici. Infine la modificazione genetica degli organi del donatore o le strategie volte ad indurre tolleranza nel ricevente potrebbero modificare la suscettibilità dell'organismo a tali agenti microbici. Recentemente è stato dimostrato che esistono retrovirus endogeni porcini che possono *in vitro* infettare cellule umane. L'infezione *in vitro* non è necessariamente predittiva di sviluppo di malattia *in vivo*, tuttavia dimostra che la possibilità di un alterato comportamento biologico nell'ospite umano o di una ricombinazione con materiale genetico umano esiste. Pertanto, vi è il rischio che nuovi patogeni possano diffondersi in modo silente non solo nella popolazione umana, ma anche negli animali.

Il trapianto di cuore, fegato e reni da donatori *concordanti*, tra una specie e l'altra di primati non umani, ha funzionato per settimane, mesi e talvolta per anni nel caso in cui il ricevente fosse stato immunosoppresso. Tuttavia i casi di rigetto acuto sono stati frequenti e l'utilizzo di una terapia immunosoppressiva ha provocato un'alta incidenza di complicazioni infettive. Allo stato attuale delle terapie immunosoppressive sembra prematuro pensare che l'uomo come ricevente di un trapianto *concordante* possa sopravvivere per lungo tempo.

Lo xenotrapianto concordante comunque avrà sempre come limite per l'uomo il numero limitato di soggetti donatori, le loro dimensioni e le prevedibili obiezioni etiche all'uso di questi animali. Per esempio i babbuini sono troppo piccoli e portano dei virus che possono essere pericolosi per l'uomo.

Per questi motivi l'interesse di quelli che si occupano di questo campo si è rivolto allo xenotrapianto discordante ed il maiale ha assunto un ruolo preminente. Infatti il maiale si può ottenere in grandi numeri e raggiunge

rapidamente le dimensioni adatte per il trapianto umano, ha una fisiologia simile a quella dell'uomo e probabilmente non ha patologie facilmente trasmissibili all'uomo.

Nonostante queste considerazioni la spinta verso l'applicazione clinica delle recenti acquisizioni nel campo delle biotecnologie applicate allo xenotrapianto è molto forte. Si deve però tenere presente che lo xenotrapianto rappresenta solo una delle possibili alternative nella situazione contingente di carenza di organi da trapiantare. Il progresso delle scienze di base, delle biotecnologie e della bioingegneria rende possibile immaginare in un prossimo futuro, ed in alcuni casi realizzare nel presente, la ricostruzione "in vitro" di tessuti ed organi sani in grado di sostituire quelli malati. E' opinione del gruppo di lavoro che la reale applicazione dello xenotrapianto, anche se potenzialmente in grado di contribuire alla soluzione del problema della carenza di organi, debba essere preso in considerazione esclusivamente per sopperire a necessità terapeutiche di emergenza, e comunque dopo aver escluso la disponibilità di organi umani nei tempi concessi dall'urgenza del paziente. Allo stato attuale lo xenotrapianto non può essere utilizzato neppure per uso compassionevole.

E' inoltre opinione del gruppo di lavoro che l'inizio di qualunque sperimentazione clinica dello xenotrapianto debba essere sostenuta e confortata dai risultati derivati da modelli preclinici. In particolare prima d'intraprendere la sperimentazione dello xenotrapianto sull'uomo e' necessario:

1. Dimostrare che gli animali riceventi lo xenotrapianto sopravvivono per un tempo sufficientemente lungo da garantire un'applicazione clinica utile.
2. Dimostrare l'assenza di trasmissione di agenti infettivi dal donatore al ricevente.

## 2. CONSIDERAZIONI GENERALI

### 2.1 Alternative allo xenotrapianto

Nella situazione contingente di carenza di organi da trapiantare, bisogna tenere presente che lo xenotrapianto rappresenta solo una delle possibili teoriche alternative.

Il progresso delle scienze di base, delle biotecnologie e della bioingegneria rende possibile immaginare in un prossimo futuro, ed in alcuni casi realizzare nel presente, la ricostruzione "in vitro" di tessuti ed organi sani in grado di sostituire quelli malati. Tuttavia è opinione del gruppo che, quantunque molte di queste possibilità terapeutiche potranno contribuire significativamente alla risoluzione del problema in questione in un futuro anche prossimo, ciononostante nel presente non possono di per se rappresentare una reale alternativa al trapianto tradizionale né tantomeno allo xenotrapianto.

### 2.2 Disporre della vita di animali per fare trapianti all'uomo

Sembra necessario fare considerazioni diverse per primati e non primati. Per quanto riguarda i primati, se gli xenotrapianti avranno successo potrà essere necessario sacrificare numerosi animali. Questo potrebbe essere drammatico per certe specie animali, ed in particolare in particolare per i primati non umani, come babbuini, scimpanzé ed altri, che non sono molti, si sviluppano lentamente raggiungendo l'età adulta in tempi relativamente lunghi, e non hanno un'elevata fertilità. Inoltre, la loro vicinanza evolutiva con la specie umana rende, nella percezione della popolazione, meno accettabile il loro sacrificio.

Pertanto, per i primati sembra che l'indirizzo eticamente più corretto sia quello di evitarne l'uso per xenotrapianti, sia nella fase di ricerca sperimentale sia in quella eventuale di applicazione clinica.

Per quanto riguarda gli altri animali, non sembra logico fare una differenza fra il sacrificare questi animali perché servano come cibo per l'uomo ed il sacrificarli per fornire una terapia che salvi una vita umana. È noto che vi è una parte minore della popolazione che contesta comunque la liceità dell'uccisione di animali, anche come fonte di cibo. Ma la maggior parte della popolazione si nutre di carne e non c'è motivo che non concordi anche sulla correttezza etica dell'uso di animali come donatori di organi.

La perdita di una vita umana è più importante della perdita della vita di un animale. Perciò la necessità di conservare una vita umana può giustificare il sacrificio di un animale per uno xenotrapianto (Koshal A. Bioethics Bulletin, 1994. <http://www.ualberta.ca/>; Institute of Biology: Response to the Advisory Group on the ethics of xenotransplantation, 1996. <http://www.primex.co.uk/iob/d13.html>).

Un'altra considerazione sull'eticità dell'uso di animali per xenotrapianto riguarda le condizioni nelle quali gli animali vengono mantenuti ed il modo con cui vengono trattati durante l'esperimento. Questo rientra nel problema generale della sperimentazione sugli animali: è considerata lecita a condizione che sia necessaria allo studio di nuove terapie e che non ci siano alternative, che venga fatta utilizzando un'appropriata anestesia e che, se dopo la sperimentazione l'animale dovesse vivere gravemente menomato o in stato di sofferenza, lo si elimini in modo indolore. Devono essere evitate agli animali le sofferenze fisiche e da stress non strettamente necessarie alla buona riuscita della sperimentazione. Il numero degli animali da esperimento deve essere il più possibile ridotto.

Esiste dunque il problema del rischio di recare dolore, sofferenza, angoscia o danni temporanei o durevoli agli animali o di produrre un animale che già alla nascita sia in queste condizioni.

Nella produzione di animali transgenici sembra difficile prevedere l'espressione del materiale genetico introdotto e l'interazione di questo con le normali funzioni organiche degli animali neonati. Questo pone il problema etico del mettere a punto metodiche di valutazione delle condizioni di disagio.

Anche una Consultazione Multilaterale del Consiglio d'Europa, riguardante la Convenzione per la protezione degli animali vertebrati utilizzati per scopi sperimentali o altri fini scientifici, ha di recente sottolineato l'importanza che deve essere rivolta al contesto ambientale delle diverse specie di animali da esperimento.

Per quanto riguarda i maiali, mammiferi che sembrano particolarmente promettenti come possibili donatori di organi da trapiantare nell'uomo, il livello minimo accettabile di benessere sembra che non debba essere inferiore a quello di un corretto allevamento di animali da carne. Peraltro, per motivi non etici bensì biologici lo standard di trattamento di animali per xenotrapianti deve essere ben superiore a quello degli animali da allevamento. Infatti, dato il rischio di trasmissione di zoonosi all'uomo (che verrà commentato in un successivo paragrafo), sembra che gli animali per xenotrapianti debbano venire mantenuti in condizioni di assenza relativa di agenti infettivi.

In una sezione sui primati non umani, il documento del Consiglio d'Europa menzionato sopra rileva come alcuni aspetti concernenti le condizioni di stabulazione e mantenimento degli animali utilizzati nella ricerca sperimentale

siano a tutt'oggi poco esplorati e manchino di sufficiente evidenza scientifica. E' dunque rilevante fornire al legislatore indicazioni e proposte che siano fondate su solide basi scientifiche mediante l'impiego di indicatori obiettivi di benessere.

Tradizionalmente la valutazione del benessere dei primati mantenuti in condizioni di laboratorio si è essenzialmente avvalsa di indicatori comportamentali. Tuttavia l'uso del solo indice comportamentale per verificare l'impatto delle condizioni di stabulazione sul benessere degli animali pone dei limiti di affidabilità. Al fine di ottenere una maggiore completezza ed oggettività dei dati sperimentali sarebbe necessario adottare un approccio multidisciplinare che consenta di valutare una combinazione di fattori di ordine fisiologico, endocrinologico, comportamentale, immunologico e biochimico. L'opinione pubblica, dimostrando sempre maggiore attenzione al rispetto delle specifiche esigenze di benessere psicofisico dei primati, sollecita la considerazione e lo sviluppo di soluzioni etiche al loro impiego sperimentale.

### **2.3 Probabilità attuali di successo di uno xenotrapianto nell'uomo**

Mentre negli allotrapianti i problemi di rigetto sono costituiti dal rigetto acuto (ora abbastanza dominabile con le terapie disponibili) e dal rigetto cronico (tutt'ora difficile da dominare) negli xenotrapianti oltre ai due tipi di rigetto menzionati ne vengono osservati anche altri due: il rigetto iperacuto (il più precoce) ed il rigetto vascolare acuto. Lo stato attuale della sperimentazione fa sperare che il problema del rigetto iperacuto sia in via di risoluzione, attraverso la produzione di animali transgenici nei quali viene inserito un gene capace di bloccare la cascata del complemento. Meno avanzata è la soluzione del problema del rigetto vascolare acuto, al quale peraltro l'attenzione dei ricercatori è rivolta. Comunque negli esperimenti di trapianto di organi suini in primati si cominciano ad osservare rigetti vascolari: questo significa che si riescono a superare in un certo numero di casi le fasi di rigetto più precoce. In ogni modo le sopravvivenze migliori che si riesce a raggiungere in sistemi sperimentali (suino-primate) sono tali da considerare etico attualmente procedere alla sperimentazione clinica degli xenotrapianti in pazienti umani; questo anche se il rigetto fosse il solo problema biologico, e non vi fosse il rischio di trasmissione di agenti patogeni, esaminato nel paragrafo successivo.

### **2.4 Rischio di trasmissione di malattie infettive dall'animale all'uomo**

#### *2.4.1 Rischi per il paziente*

Non vi sono allo stato attuale conclusioni scientifiche certe in ordine alle patologie infettive trasmissibili dall'animale all'uomo con xenotrapianti. E' peraltro noto che tutte le specie animali ospitano virus, e fra questi anche dei retrovirus. Quindi sussiste in linea di principio la possibilità che agenti patogeni animali presenti in un organo trapiantato infettino il ricevente di trapianto. Un esempio è probabilmente costituito dal virus HIV, che si pensa sia stato trasmesso all'uomo da scimmie. Un altro esempio è quello dell'Encefalopatia Spongiforme Bovina, trasmessa dai bovini all'uomo attraverso i prioni.

Bisogna comunque considerare che l'allograpianto stesso non è scevro da questo tipo di rischi per il paziente; sono infatti stati descritti nella letteratura scientifica numerosi casi di pazienti che hanno contratto l'AIDS, l'epatite ed altre malattie infettive in conseguenza di un allotrapianto.

Sussiste il rischio aggiuntivo di mutazione di un virus noto, che potrebbe dare origine ad un agente patogeno nuovo contro il quale non esistono ancora misure di difesa; perciò potrebbero richiedere la messa a punto di nuovi mezzi per combatterli. Inoltre un virus che sia stato trasmesso all'uomo con un organo trapiantato potrebbe migrare fuori dell'organo ed invadere altre zone dell'organismo umano ospite: in questo caso, anche la rimozione dell'organo non annullerebbe l'infezione.

Si prende atto che nel 1999 è stata pubblicata su *Science* (Paradis K., Langford G., Long Z., Heneine W., Sandstrom P., Switzer W.M., Chapman L.E., Lockey C., Onions D., XEN 111, Otto E.: Search for cross-species transmission of porcine endogenous retrovirus in patients treated with living pig tissue. *Science* 285:1236-1241, 1999) un'analisi di vari studi, compiuti in periodi che andavano da un mese prima a 12 anni prima, fatti in otto Paesi e che hanno coinvolto in tutto 160 pazienti i quali con varie modalità erano stati in contatto con cellule di maiale. 36 pazienti erano trattati anche con immunosoppressivi, aumentando perciò la probabilità che se un agente patogeno fosse stato trasmesso, non avrebbe potuto essere eliminato dall'apparato immunologico del paziente. I campioni ottenuti dai pazienti sono stati esaminati in tre diversi laboratori; è stata ricercata la presenza di DNA e di RNA di retrovirus, e quella di anticorpi anti-retrovirus. La ricerca di RNA è stata negativa, quella del DNA ha rivelato microchimere in 23 casi; sono stati trovati in quattro casi anticorpi anti-PERV, ma specifici per la GAG: sembra perciò che si tratti di reattività crociata.

Questo rapporto sembra incoraggiante, ma da solo non costituisce dimostrazione sufficiente che cellule animali non trasmettono all'uomo agenti patogeni pericolosi.

#### *2.4.2 Rischi per la popolazione*

Nel caso che un virus o un prione sia trasmesso al ricevente di uno xenotrapianto, sussiste la possibilità che da quel paziente venga trasmesso ad altre persone. La trasmissione potrebbe non essere facile: la sua probabilità di trasmissione sarebbe probabilmente diversa per patogeni diversi. In ogni modo, non è escludibile. Allora potrebbe provocare diffusioni generalizzate anche rilevanti.

Questo rischio può essere in buona parte prevenuto, allevando gli animali in un ambiente privo di patogeni specifici. Pertanto è eticamente corretto allevare gli animali destinati allo xenotrapianto in tali condizioni. Per garantirlo, sembra necessario chiedere che venga definita una specifica normativa che preveda controlli adeguati.

I benefici per il paziente perciò non possono essere dissociabili dai rischi, pur meno probabili, di diffusione di malattie infettive nella popolazione umana. Qualora questi rischi vengano effettivamente dimostrati, allora si dovrà considerare se esiste un "equo bilanciamento" tra il beneficio diretto e chiaramente determinabile per il singolo paziente e gli effetti indiretti che possono investire soggetti non identificabili al momento attuale. Se gli effetti indiretti non fossero gravi, o comunque fossero dominabili con terapie adeguate, si potrebbe concludere che vi è un equo bilanciamento e gli xenotrapianti sono eticamente accettabili.

Al momento attuale si condivide la richiesta, avanzata sia dal Consiglio d'Europa (Raccomandazione 1399 del 29 Gennaio 1999) sia dal Comitato Nazionale di Bioetica, di una moratoria riguardo agli interventi di xenotrapianto sull'uomo.

#### **2.5 Accettabilità psicologica da parte di un paziente di un trapianto con organo animale**

Nel caso che ora si iniziasse a sperimentare lo xenotrapianto sull'uomo, la carenza attuale di conoscenze sulla trasmissione di infezioni obbligherebbe a tenere sotto stretto controllo i pazienti trapiantati per periodi anche lunghissimi: anni, fino anche a tutta la vita. Bisognerebbe anche porre ad essi limitazioni che consentano di minimizzare il rischio che trasmettano un'eventuale agente patogeno. Tutto questo sarebbe gravoso da sopportare per il soggetto, e porrebbe anche il problema sulla liceità etica di imporre tali limiti alla libertà personale.

#### **2.6 Accettabilità da parte dell'opinione pubblica del concetto di trapianti da animali a uomini**

Il modo con cui una popolazione avverte i problemi e reagisce ad essi è in funzione della sua storia e delle sue abitudini, ed è suscettibile di cambiare con il tempo. Per esempio, nella maggior parte dei Paesi vengono consumati in grandi quantità liquori, sigarette, caffè, mentre è proibita la vendita senza ricetta medica di farmaci che comportano minori rischi per la salute.

E' difficile fare supposizioni sul modo di sentire della nostra popolazione riguardo all'adozione di xenotrapianti nella clinica, ma le recenti reazioni dell'opinione pubblica nei confronti degli alimenti transgenici hanno mostrato che non tutto quello che la tecnologia avanzata propone viene considerato accettabile. Un insegnamento che è parso di poter trarre è che nelle fasi precedenti alla proposta di utilizzazione, sia opportuno informare il pubblico della ricerca, dei suoi obiettivi e dei suoi progressi, ed essere disponibili ad affrontare dibattiti per chiarire aspetti controversi.

### 3. STUDI CLINICI SPERIMENTALI

Il gruppo ritiene indispensabile che eventuali sperimentazioni nell'uomo soddisfino le linee guida relative ai criteri di efficacia, sicurezza ed ai controlli di qualità per gli studi clinici sperimentali e la buona pratica clinica nonché i criteri di accreditamento delle strutture sede della sperimentazione clinica degli xenotrapianti e i requisiti sottoriportati.

#### 3.1 Condizioni essenziali per procedere alla sperimentazione dello xenotrapianto sull'uomo

- a) Dimostrazione che gli animali riceventi lo xenotrapianto sopravvivono per un tempo sufficientemente lungo da garantire un'applicazione clinica utile.
- b) Assenza di trasmissione di agenti infettivi dal donatore al ricevente e al personale coinvolto nelle sperimentazioni.

#### 3.2 Requisiti per la sperimentazione clinica dello xenotrapianto

- a) Garanzia della massima sicurezza possibile per i soggetti trattati, i familiari, il personale sanitario e la popolazione generale.
- b) Limitazione dell'accesso ai soli pazienti in lista d'attesa d'urgenza di allotrapianto per i quali non vi siano altre soluzioni terapeutiche.
- c) Fornitura di tessera informativa al paziente con numero verde accessibile 24 ore su 24 per informazioni e comunicazioni da parte del paziente o dei medici curanti.
- d) Garanzia di una comunicazione corretta dei risultati ai mass-media e all'opinione pubblica, in modo da non influire negativamente sui programmi di reperimento e trapianto di organi da donatore cadavere.

#### 3.3 Requisiti dei Centri di sperimentazione

- a) I centri sede di sperimentazione devono, quale requisito essenziale, avere una comprovata e consolidata esperienza del "modello xenotrapianto".
- b) I centri sede di sperimentazione devono presentare le opportune credenziali di accreditamento dei locali, camere operatorie, laboratori e del personale coinvolti nello studio.
- c) I Centri devono essere in grado di effettuare sul paziente, sui familiari e sui sanitari coinvolti nello xenotrapianto tutte le indagini richieste per il monitoraggio clinico e infettivologico pre e post-trapianto. I Centri sono responsabili di tutte le attività di biovigilanza.
- d) I Centri dovrebbero essere scelti tra quelli già autorizzati al trapianto allogeneico. La sperimentazione dovrebbe essere inizialmente limitata a uno o due Centri, autorizzati al trattamento di pochi casi.
- e) La possibilità di allargare la sperimentazione deve essere vincolata ai risultati osservati con il/i Centri pilota.

#### 3.4 Modalità operative della biovigilanza

- a) *Biovigilanza del paziente.* Il follow-up clinico e di laboratorio dovrà essere mirato alla ricerca di eventuali complicanze infettive o di altra natura correlate allo xenotrapianto. La biovigilanza del paziente ha termine con il suo decesso
- b) *Gestione dei campioni biologici seriali del paziente.* La raccolta e l'archiviazione dei campioni biologici del paziente devono essere condotte in modo da poter rintracciare i campioni potenzialmente implicati nello sviluppo di infezioni. Anche i campioni prelevati dall'organo trapiantato e da tessuti del paziente in caso di decesso dovranno essere adeguatamente archiviati e conservati presso le Bio-Banche Locali e Centrali. La gestione dei campioni biologici costituisce parte integrante del programma nazionale di protezione della salute pubblica in tema di xenotrapianti, perciò parte dei campioni biologici gestiti dal Centro di sperimentazione dovranno essere tenuti a disposizione dell'Autorità Sanitaria, secondo modalità concordate.

- c) *Caratteristiche dei campioni biologici.* Siero, plasma e leucociti devono essere raccolti e conservati in base ad intervalli predefiniti. Almeno due aliquote di leucociti vitali devono essere criopreservati. Inoltre, campioni di DNA e RNA estratti da leucociti o siero devono essere congelati. Infine, devono essere adeguatamente conservati campioni dell'organo e del tessuto xenogenico prelevati in caso di espianto o decesso del paziente.
- d) *Frequenza minima di raccolta dei campioni biologici.* Un mese prima del trapianto (o comunque non appena possibile nel periodo pre-trapianto) devono essere prelevate due serie di campioni basali. Il set di campioni deve essere prelevato subito dopo il trapianto e a distanza di 15 giorni, 1, 3, 6, 12 mesi. Successivamente dovranno essere effettuati controlli annuali, per tutta la durata di vita del paziente. L'evoluzione clinica del paziente potrebbe richiedere una frequenza di campionamento maggiore.
- e) *Follow up infettivologico.* I riceventi devono essere sottoposti ad un programma di follow-up teso all'identificazione precoce di eventuali agenti infettivi. In caso di agenti infettivi isolati dall'organo/tessuto trapiantato, campioni di fluidi biologici, siero, plasma, leucociti, dovrebbero essere analizzati ad intervalli di tempo periodici, al fine di scoprire la presenza degli stessi agenti infettivi identificati in seno allo xenotrapianto. Gli studi di vigilanza devono essere condotti in modo da rilevare la presenza di virus che determinano infezioni latenti in assenza di sintomi (es. herpes e retrovirus). Considerando anche lo stato di immunosoppressione del ricevente, devono essere impiegate tecniche di identificazione virale adeguate. La sensibilità, specificità e la validità delle metodiche di identificazione utilizzate devono essere provate e documentate in condizioni sperimentali simili a quelle che si realizzano nello xenotrapianto.
- f) *Follow-up clinico.* I Centri di sperimentazione devono operare in modo da rendere valutabile il raggiungimento degli *end-point* clinici indicati dallo studio al fine di rendere confrontabile l'efficacia dello xenotrapianto nei confronti di altre soluzioni terapeutiche.

### 3.5 Consenso informato dei pazienti candidati

- a) Deve essere considerata l'informazione relativa al fatto che il paziente potrebbe essere sottoposto ad isolamento sanitario, familiare e sociale (almeno nel primo periodo post-trapianto). Il consenso informato deve coinvolgere il partner nella prospettiva di condividere con il paziente un ipotetico rischio di patologie sessualmente trasmesse, ivi compreso il rischio di trasmissione infettiva alla prole.
- b) Il paziente dovrà osservare una serie di norme preventive nei confronti del personale sanitario e del nucleo familiare. Per questo e altri aspetti critici è auspicabile che un gruppo dedicato di esperti (etici, medici legali, giuristi) studi un modello di consenso informato ad hoc, estendendo la partecipazione anche a pazienti in lista d'attesa di trapianto e trapiantati.

### 3.6 Monitoraggio dei sanitari

- a) Il Centro di sperimentazione è responsabile dell'attuazione del piano di prevenzione e monitoraggio delle infezioni trasmissibili al personale sanitario implicato nello xenotrapianto.
- b) Oltre alle consuete misure preventive ospedaliere misure aggiuntive saranno richieste in caso di xenozoonosi sospette o certe.
- c) Il piano di prevenzione deve includere tre fasi:
  - training degli operatori sanitari;
  - biovigilanza dei sanitari esposti;
  - monitoraggio del personale in caso di infezione.

*Ciascuna fase sarà descritta in apposite procedure operative, in accordo alla normativa vigente.*

### 3.7 Registri dello xenotrapianto

- a) Ogni sperimentazione sullo xenotrapianto richiede l'implementazione di un Registro Locale (di cui è responsabile il Centro di Sperimentazione). Tale registro è organizzato a 3 livelli:
  - registro degli xenotrapianti, ove sono riportati tutti i dati relativi agli animali donatori, i trapianti effettuati, i riceventi trattati; sono ivi inclusi anche i dati dei sanitari coinvolti nei trapianti e quelli degli eventuali partners sessuali dei riceventi.
  - registro dei sanitari e dei non-sanitari che potrebbero essere stati esposti ad agenti infettivi per il tramite del paziente trapiantato.

- registro dei singoli pazienti trattati, con dati dettagliati sul follow-up clinico e documentazione del monitoraggio effettuato sugli animali donatori.
- a) Il Centro di sperimentazione è responsabile della trasmissione dei dati al *Registro Nazionale per lo xenotrapianto*, che ha tre funzioni:
- verifica dell'appropriatezza dei casi trattati
  - verifica del rispetto delle linee-guida
  - verifica dei risultati clinici dei trapianti effettuati.

A questo proposito devono essere definiti gli end-points clinici dello xenotrapianto, in termini di sopravvivenza del paziente, funzione dell'organo trapiantato e assenza di complicanze cliniche rilevanti. Un esempio dell'identificazione degli end-points clinici è contenuto nel documento del Consiglio Superiore di Sanità dal titolo "Linee-guida per la sperimentazione clinica del fegato bio-artificiale". Dovranno del pari essere individuati parametri per la misurazione della qualità di vita del paziente trapiantato, analogamente a quanto già in uso per i già citati allotrapianti. (es. reinserimento nell'ambito familiare, sociale, lavorativo, etc.). Il monitoraggio di questi tre aspetti costituirà elemento vincolante per la continuazione o la sospensione della sperimentazione.

### **3.8 Collegamento internazionale dei Registri per lo Xenotrapianto**

L'OMS ha recentemente espresso la disponibilità ad implementare un Registro Internazionale sullo xenotrapianto, con funzioni di raccolta dei dati dei casi trattati e dei materiali biologici relativi. La centralizzazione e il rapido scambio di informazioni tra i paesi sedi di sperimentazione rappresentano infatti gli strumenti da adottare per identificare e circoscrivere eventuali focolai xenozoonotici nella popolazione.

## 4. CERTIFICAZIONE DI ANIMALI E ALLEVAMENTI

*Linea guida relativa ai criteri di sicurezza e controllo di qualità di materiali di origine dalla specie suina da utilizzare per trapianti nell'uomo.*

### 4.1 Introduzione

### 4.2 Obiettivi e principi

Obiettivo della presente linea guida è quello di fornire gli elementi indispensabili per delineare il contesto tecnico-normativo all'interno del quale individuare le condizioni essenziali per evitare l'insorgenza di zoonosi

**attraverso la potenziale trasmissione all'uomo di:**

- a) microrganismi patogeni noti, riconosciuti come agenti primari di zoonosi;
- b) microrganismi poco noti o a tutt'oggi sconosciuti (in questo caso, sebbene per definizione il rischio di trasmissione non potrà mai essere completamente eliminato, il massimo impegno è stato e dovrà essere profuso per assicurare le condizioni ottimali per minimizzare tale rischio),

**in seguito al trasferimento di cellule, tessuti e organi derivati da animali appartenenti alla specie suina.**

**I principi fondamentali e i criteri utilizzati per individuare e definire requisiti standard in relazione:**

- a) alle fonti di approvvigionamento e selezione degli animali donatori, in particolare riguardo:
  - alla scelta, all'impiego e al controllo della specie, categoria, qualità e numero di animali;
  - alla definizione di idonee condizioni d'allevamento;
- a) alla valutazione degli agenti infettivi che possono rappresentare un fattore di rischio nell'esecuzione di xenotrapianti;
- b) alla compilazione di una lista degli agenti di cui al punto 2) e di una più ristretta in base a realistiche o potenziali condizioni di rischio ;
- c) alla valutazione qualitativa del rischio di trasmissione di microrganismi patogeni;
- d) alla valutazione delle strategie da applicare al fine di minimizzare il rischio di trasmissione di cui al punto 4), in particolare riguardo:
  - alla promozione di un elevato stato sanitario negli animali donatori;
  - al monitoraggio e al controllo analitico e microbiologico degli animali donatori,

sono stati desunti sia in base alle più aggiornate conoscenze tecnico-scientifiche in materia che alla consultazione di programmi e protocolli già predisposti e/o adottati da organismi nazionali (Consiglio Superiore di Sanità), internazionali (OMS, Commissione UE) e da altri Paesi

(Germania, Spagna, Svezia, Svizzera, Nuova Zelanda, USA, ecc.),

tenuto conto di aspetti etici e normativi inerenti alla salvaguardia del benessere umano e animale.

La programmazione dello stato sanitario degli animali deve essere regolata, innanzi tutto, attraverso norme stabilite dalla legislazione vigente in materia di lotta alle malattie infettive (Regolamento di Polizia Veterinaria e disposti vari) e, per quanto riguarda il benessere animale, alle misure speciali previste per l'allevamento e il mantenimento di suini esenti da patogeni specifici (SPF) e/o geneticamente modificati. Il rispetto e la vigilanza sull'applicazione delle misure e delle norme di seguito riportate e, soprattutto, la disponibilità di protocolli operativi e il mantenimento di archivi storici relativi a eventi occorsi, a materiali, metodologie, processi di produzione, controllo, valutazione ecc. (impiegati o sviluppati nelle diverse fasi di predisposizione degli interventi finalizzati all'esecuzione di xenotrapianti), rappresentano aspetti essenziali per il raggiungimento e la certificazione di adeguati

standard operativi e qualitativi dell'intero processo. In tal modo può essere garantita la verifica della correttezza delle procedure e il tempestivo accertamento del verificarsi di errori all'interno del sistema ("trace back"). Tutto ciò garantendo e a garanzia della salvaguardia del benessere collettivo (complesso uomo-animale-ambiente). POS, PO, documenti e campioni dovranno sempre essere resi disponibili alle Autorità sanitarie e di controllo competenti e alle particolari Commissioni all'uopo designate. Le disposizioni di seguito riportate dovranno essere collocate, senza ulteriori riferimenti nel testo, nei punti specifici trattati dalla presente linea guida.

### **4.3 Adempimenti normativi e certificazioni relativi a:**

#### *4.3.1 Benessere animale*

Gli animali utilizzati per gli xenotrapianti devono essere considerati animali da esperimento e pertanto rientrare nel quadro normativo definito dal D.L. 116/92, artt. Specifici. Tale disposto, regola le fasi di produzione, stabulazione e controllo sanitario degli animali (non finalizzato però all'esclusione di xenozoonosi); individua invece il profilo professionale delle persone fisiche che eseguono le operazioni di prelievo dei substrati biologici con indicazioni precise del luogo in cui questo può essere condotto. La conformità con quanto predisposto dal D.L. 116/92 rappresenta un pre-requisito essenziale per l'esecuzione di qualsiasi tipo di esperimento finalizzato allo xenotrapianto. All'animale dovranno essere garantite condizioni di vita confortevoli e la possibilità di comportamento secondo la natura della specie. In particolare, a tal riguardo, si sottolinea come qualsiasi modificazione genetica apportata all'animale, potrà essere accettata solo a condizione che non provochi alterazioni del comportamento naturale e non produca stati di sofferenza o malattie. Per l'accertamento di tali condizioni è necessario il controllo e il monitoraggio da parte di personale altamente qualificato. Dovranno inoltre essere messe in atto, in sintonia con i riscontri delle più fondate evidenze scientifiche, tutte le condizioni in grado di evitare o ridurre al minimo, stati di eventuale disagio, angoscia, dolore; a tal fine, su base individuale, dovranno essere applicati appropriati trattamenti sedativi, analgesici, anestetici. Dovranno inoltre essere definiti precisi "end-points" delle sperimentazioni. Qualsiasi esperimento condotto su animali vivi dovrà essere eseguito su richiesta e sotto la supervisione di personale altamente qualificato e di accertata esperienza e competenza.

#### *4.3.2 Utilizzo di animali geneticamente modificati*

Comporta la notifica, la definizione del livello di autorizzazione, del grado di confinamento della struttura e l'applicazione delle norme stabilite ai sensi dei DD.LL. 91/93 e 92/93.

#### *4.3.3 Applicazione delle norme di sicurezza*

Viene accertata dalle Autorità pubbliche competenti e dai responsabili delle équipes di trapianto secondo quanto indicato dalla direttiva 2000/54/CE relativa alla classificazione degli agenti biologici e dalle norme di cui al DL 626/94, Titolo VIII e successive modifiche (relative al rischio biologico e alle specifiche misure di contenimento a tutela della salute e per la sicurezza dei lavoratori).

#### *4.3.4 Applicazioni di norme specifiche riguardanti la legislazione veterinaria relativa all'impiego di farmaci, prodotti immunizzanti, additivi per gli alimenti da destinare agli animali*

Ai sensi dei DD.LL. 119/92 e 66/93 aggiornati con i DD.LL. 47/97 e 79/97 e della direttiva 70/524/CEE e successive modifiche.

#### *4.3.5 Norme di rilascio di specifiche autorizzazioni e accreditamento delle strutture* (es. relative alla conformità alle BUONE PRATICHE DI LABORATORIO, ai sensi del D.L. 120/92)

#### *4.3.6 Svolgimento di visite e controlli ispettivi periodici da parte delle Autorità competenti* (ai sensi del disposto precedente).

#### *4.3.7 Adempimenti di carattere amministrativo*

In particolare riferiti alle condizioni di biosicurezza, quali ad esempio, l'obbligo del mantenimento di registri di carico/scarico di animali e farmaci (ad es., gestione dell'armadio farmaceutico, ai sensi degli artt. 34-35 del DL 119/92 e successivi aggiornamenti) o relativi alla movimentazione del personale

#### **4.4 Procedure operative standard (pos) e protocolli (po)**

Dovranno essere forniti i protocolli dettagliati relativi a:

- criteri per l'ammissibilità degli animali (fonti di approvvigionamento, pratiche di selezione genetica, definizione dei parametri fisiologici, chimici, produttivi e riproduttivi, ecc.);
- sistemi di progettazione della struttura (con incluse piante dettagliate), in particolare con specifiche riguardanti la tipologia e la dimensione dell'impianto, nonché i locali di
  1. confinamento (barriere o siti multipli);
  2. contenimento (stoccaggio);
  3. isolamento (quarantena)e i sistemi di
  1. confinamento per impedire l'accesso ad artropodi, roditori, uccelli, altri animali e veicoli animati e non (inclusi protocolli di movimentazione rifornimenti, attrezzi, provviste, accessori, ecc.);
  2. isolamento ed eliminazione di animali malati/morti;
  3. smaltimento dei reflui e degli animali eliminati;
- struttura gestionale dell'impianto (incluso l'organigramma della direzione dell'impianto) in relazione, in particolare, ai criteri per la corretta stabulazione e cura degli animali relativi a:
  1. origine e modalità di distribuzione di alimenti e bevande (impiego di farmaci e additivi nell'alimentazione, ricorso a diete, ecc.);
  2. pulizia dei locali di stabulazione (incluse procedure di disinfezione e disinfestazione);
  3. movimentazione degli animali (introduzione, spostamento, trasporto)
    1. accreditamento del personale;
- programmi di sorveglianza e monitoraggio dello stato sanitario degli animali, inclusi studi relativi al controllo :
  1. dei parametri fisiologici, del comportamento, della capacità produttiva, ecc.;di specifici programmi di biosicurezza (es. relativi alla capacità d'impedire l'introduzione di
  2. agenti infettivi, ricorso a animali sentinella da monitorare per tutto il ciclo di vita, studi retrospettivi e di previsione, ecc.);
    1. dell'impiego di vaccini (sicurezza, effetti collaterali, immunogenicità, durata dell'immunità, ecc.) e dell'uso dei farmaci;
- programmi di assicurazione e controllo della qualità (controlli delle performances, controlli analitici e microbiologici, ispezioni interne/esterne);
- procedure di depistaggio e qualificazione degli animali di tipo:
  1. pre-clinico
  2. individuale
  3. finale/certificazionenei confronti di agenti infettivi noti
- procedure di esclusione degli animali in funzione di una lista di agenti infettivi noti e no;
- procedure di definizione/gestione del rischio di introduzione di agenti infettivi noti e no;
- procedure di selezione, qualificazione e monitoraggio sanitario del personale addetto alle strutture, in contatto con gli animali;
- tecniche e strumentario (es. utilizzati per la messa a punto di modelli animali su suino, tecniche di selezione animali SPF, dei sistemi di produzione per siti multipli, di medicazioni precoci per lo svezzamento, isterectomia, parto cesareo, somministrazione di vaccini, ecc.);

- accertamenti di laboratorio, in particolare delle tecniche di validazione (sensibilità/ specificità/ riproducibilità) dei saggi impiegati per l'esecuzione di esami:
  1. ematici e bioumorali
  2. urine
  3. microbiologici ( sierologia anticorpale ed esami colturali su materiale biologico)
  4. immunologici ( autoimmunità, dosaggi farmacologici)
  5. virologici
  6. autoptici
  7. istologici

#### **4.5 Acquisizione e archiviazione di documenti e campioni - identificazione degli animali**

Punto fondamentale della sicurezza sanitaria è la registrazione di qualsiasi evento occorso nella struttura di stabulazione degli animali.

Presso la struttura deputata alla fornitura di animali donatori per xenotrapianti, dovrà essere predisposto un sistema di raccolta e archiviazione dei dati relativi a:

- fonte di approvvigionamento e fornitura di ciascun animale, organo, tessuto, ecc., utilizzato per xenotrapianti;
- centri di xenotrapianti ai quali il materiale di cui al punto a) sia stato inviato;
- fonti di approvvigionamento e fornitura di alimenti ( inclusi farmaci ed additivi per alimenti);
- fonti di approvvigionamento e fornitura di farmaci e vaccini;
- risultati di adeguati sistemi di vigilanza sanitaria;
- analisi storica ( per l'intera durata del ciclo di esistenza della struttura) della situazione sanitaria dell'allevamento; in particolare dovrà essere mantenuta idonea documentazione relativa a:
  - a) misure che costituiscono sistemi standard di cura veterinaria ( es. applicazione di antiparassitari, vaccini, ecc.);
  - b) programmi di sorveglianza e monitoraggio dell'allevamento o della colonia;
  - c) totalità degli incidenti che possono aver avuto ripercussione sullo stato sanitario dell'allevamento o della colonia ( es. focolai di malattia, morti improvvise, rottura dei sistemi di barriere ambientali).

Presso la stessa struttura dovranno essere mantenuti, possibilmente per un periodo di tempo indeterminato, ma necessariamente per un periodo minimo di 50 anni, registri di vario genere e in particolare sanitari, nonché campioni di siero o altri materiali biologici ( “ biobanca”) di derivazione da ciascun animale e/o da membri del personale diversamente addetto o coinvolto nel processo di sviluppo di xenotrapianti. Ciò, al fine di poter identificare l'insorgenza di malattie inattese sia nell'allevamento/colonia sia nel singolo animale o nel ricevente lo xenotrapianto o in persona a contatto con quest'ultimo.

Un sistema computerizzato di raccolta di informazioni e dati relativi a tutti gli avvenimenti occorsi nella struttura e all'analisi storica di quelli rapportabili alle condizioni sanitarie dell'allevamento o della colonia, deve essere mantenuto e le registrazioni monitorate regolarmente per valutare la produttività del sistema e identificare l'insorgenza di problemi che richiedono ulteriori accertamenti.

Dovrà essere altresì conservata per un periodo di tempo illimitato, documentazione di carattere sia analitico (es. dati genetici) che sanitario (es. relativa al controllo permanente operato sull'intero allevamento/colonia e sul singolo animale).

Nell'eventualità che la struttura cessi di operare, tutta la documentazione ed i campioni di materiale dovranno essere trasferiti ai rispettivi centri clinici addetti allo xenotrapianto o tali centri dovranno essere informati dello spostamento degli archivi presso altre sedi.

Tutti gli animali devono essere identificati in maniera permanente entro 24 ore dalla nascita.

Dovrà essere assicurato un idoneo sistema di numerazione o altra identificazione degli animali al fine da rendere semplice, accurata e rapida la connessione tra vari sistemi di raccolta di informazioni eventualmente applicati.

## 4.6 Aspetti tecnici

### 4.6.1 *Criteri per la selezione degli animali donatori*

La condizione essenziale richiesta per la selezione di animali da impiegare per la fornitura di materiali biologici per xenotrapianti è rappresentata dalla possibilità di una precisa definizione e caratterizzazione dello stato microbiologico dell'animale donatore. Quest'ultimo viene individuato sia in conformità ad una lista di agenti patogeni definiti ( es. quella acclusa alla presente linea guida, da aggiornare continuamente), che alle specifiche indicazioni del protocollo sperimentale predisposto.

Tale considerazione comporta necessariamente l'impossibilità di utilizzare animali di tipo "convenzionale " ( gnotoxenici/oloxenici), rientrando in questa generica definizione tutti gli animali allevati senza alcuna restrizione nell'impianto della flora microbica. Lo stato microbiologico di questi animali risulta pertanto indeterminato o minimamente definito e di conseguenza in essi è possibile ritrovare qualsiasi tipo di microrganismo patogeno.

In tale categoria di animali rientrano certamente gli animali selvatici, quelli provenienti da mattatoi o da ambienti condizionati.

Al contrario, animali gnotobiotici ( axenici o germ-free e gnotoxenici/SPF) possono essere ritenuti validi candidati per la fornitura di materiali biologici da utilizzare per xenotrapianti. Sebbene tecnicamente possibile, l'allevamento di suini "germ-free" risulta impraticabile ( allevamento in isolatori barrierati, difficoltà estreme nell'evitare il contatto con tutte le possibili fonti di contaminazione) e indesiderata ( benessere animale). Gli animali SPF rappresentano l'unica, minima alternativa all'impiego di animali gnotobiotici. Si tratta di animali selezionati da speciali ceppi di suini donatori provenienti da colonie di elevato stato sanitario ( non necessariamente gnotobiotici) per i quali sia stata accertata in partenza la normale e perfettamente definita flora microbiologica. Per tali animali deve essere mantenuto un sistema di archiviazione dei dati per un periodo di tempo indefinito; deve essere nota e provata l'assenza di determinati agenti patogeni che, nel caso degli xenotrapianti, siano stati dimostrati o ipotizzati di rilevanza significativa per il rischio di trasmissione inter-specie di agenti causa di varie sindromi infettive.

Gli animali selezionati all'origine per fondare le colonie SPF dovranno essere stati acquisiti da centri e/o strutture autorizzate e trasportati a destinazione nel pieno rispetto della normativa vigente. All'arrivo dovranno essere sottoposti a esame clinico, ad approfonditi accertamenti di laboratorio, messi in un regime di rigida quarantena e sottoposti ad un processo di depistaggio microbiologico in grado di identificare tutti gli agenti trasmissibili noti o sospetti ( vedasi lista relativa all'analisi del rischio). In caso di accertata presenza di agenti infettivi nel periodo di quarantena, dovranno essere attuate tutte le misure e le procedure necessarie per escludere il mantenimento del patogeno nella colonia. Una volta riconosciuti idonei a creare una colonia di animali SPF, questi ultimi (che rappresenteranno il nucleo dell'allevamento) dovranno essere allocati in strutture opportunamente identificate ( in base ad una serie di requisiti di seguito descritti) e potranno dare avvio alla produzione di animali donatori di materiali biologici da utilizzare per l'esecuzione di xenotrapianti ( sono state necessarie sino a quattro generazioni di animali progenitori per ottenere soggetti idonei a tal fine). Gli animali SPF sono allevati in colonie chiuse ( "closed herd") e protette ( certificate negative per una varietà di patogeni specifici per la specie e microbiologicamente ben definite e controllate), in ambienti in grado di ridurre al minimo il rischio di esposizione ad agenti infettivi.

Nessun animale risultato positivo nei confronti di patogeni per i quali la colonia sia stata certificata SPF, può essere ammesso nella colonia stessa.

### 4.6.2 *Requisiti*

- Gli animali della specie suina donatori di materiali biologici da utilizzare per l'esecuzione di xenotrapianti devono derivare da unità di allevamento (colonie):
- di rilevante consistenza numerica;
- dedicate esclusivamente alla fornitura di animali donatori di materiali biologici per xenotrapianti;

- mantenute in condizioni di biosicurezza tali da garantire il mantenimento di un elevato stato sanitario;
- separate da unità di allevamento dedicate ad altri scopi;
- le scrofe donatrici ed i progenitori sono selezionati con l'obiettivo primario di produrre forte eterosi nella progenie; le scrofe, madri di animali donatori, dovranno essere state sottoposte a idonea selezione che prevede depistaggi patologici e sierologici, quest'ultimi a diverse epoche di gravidanza (80-94-108° giorno);
- devono essere mantenuti speciali sistemi di archiviazione dei dati genetici riguardanti i progenitori degli animali futuri donatori; ciascuno di questi deve poter essere rintracciato individualmente, direttamente fino alle due generazioni precedenti e, indirettamente ancor più indietro, attraverso sistemi di archiviazione dei dati genetici;
- dovrebbero poter essere attuati sistemi artificiali di procreazione ( inseminazione artificiale e trasferimento di embrioni), chirurgici per il parto ( isterectomia, isterotomia) e di soppressione dell'allattamento materno, al fine di ridurre la possibile colonizzazione di agenti infettivi correlati a tali pratiche.
- gli animali donatori devono essere allevati in condizioni "barrierate" (stabilimenti in grado di garantire almeno un livello di biosicurezza di classe II) e in " stanze multiple isolate " (consigliato un numero basso di animali per stanza). E' consentito l'utilizzo di vaccini per controllare alcune patologie ( es. mal rosso, leptospira, parvovirosi, ecc); tuttavia gl'interventi vaccinali dovranno essere gradualmente evitati, almeno nei confronti di malattie virali che richiedono l'impiego di presidi immunizzanti allestiti con virus vivo ( in questo caso le condizioni del " barriera" dovranno essere ancora più stringenti).
- gli animali donatori devono essere testati e qualificati SPF nei confronti di specifici agenti e dichiarati idonei secondo il protocollo clinico prestabilito ( es. per il trapianto di cellule di pancreas, l'impiego di suinetti di 7-10 giorni è da preferire per il ridotto rischio sia di infettività connesso con la presenza di anticorpi materni acquisiti passivamente che di reattività immunitaria correlata con la giovane età).
- presso la struttura, al fine dell'accertamento dell'idoneità degli animali, per quanto riguarda la certificazione dello stato SPF, dovranno essere disponibili veterinari di provata esperienza nel settore delle malattie infettive prevalenti nella specie animale in questione. Lo staff veterinario dovrà inoltre essere in grado di sviluppare dettagliate POS al fine di assicurare condizioni di allevamento in grado di impedire l'introduzione di agenti infettivi e mantenere un'attiva collaborazione con accreditati laboratori di microbiologia.

#### 4.7 Caratteristiche di progettazione della struttura

Un livello minimo di biosicurezza della struttura corrispondente alla classe II dovrebbe essere in grado di assicurare il mantenimento del raggiunto stato SPF degli animali donatori.

L'impianto deve essere collocato in posizione tale da ridurre al massimo la possibilità di introduzione di agenti infettivi. Tale condizione può essere raggiunta selezionando, ad esempio, aree di territorio isolate ( si suggerisce un intervento di depopolamento totale, seguito da massiccia decontaminazione di tutta l'area e quindi da un ripopolamento eseguito esclusivamente con animali caratterizzati da un elevato stato sanitario) e protette dall'accesso esterno. L'impianto deve essere progettato in conformità a sistemi di tipo " barriera" tali da assicurare un adeguato isolamento da uomini ed animali mediante barriere protettive a sicurezza totale. Inoltre deve essere regolamentato l'accesso di persone ed animali secondo i seguenti criteri

- a) il numero delle visite e dei visitatori, come pure il traffico pedestre, devono essere mantenuti al minimo livello;
- b) solo il personale necessario è autorizzato ad entrare;
- c) è obbligatorio l'uso della doccia da parte del personale autorizzato ad entrare e dei visitatori ammessi nell'impianto;
- d) è obbligatorio l'uso esclusivo di indumenti specifici forniti dall'impianto stesso, in sostituzione dei propri;
- e) i visitatori non devono aver avuto contatti con animali di altri allevamenti nei cinque giorni ( quattro notti) precedenti la visita;
- f) è obbligatorio l'uso di stivali disinfettati prima dell'entrata, di copri-scarpe, copricapo, maschere, guanti, camici, ecc.;
- g) tutti i suini devono essere mantenuti in ambienti chiusi;
- h) l'impianto deve essere costruito con materiali a prova di roditori;
- i) deve essere effettuato un costante ed intensivo controllo contro la presenza di roditori, uccelli, artropodi, insetti, ecc.;
- j) devono essere tenuti lontani altri animali come quelli da compagnia, selvatici e bestiame;

Ulteriori misure devono essere applicate per il controllo dell'introduzione di agenti infettivi:

- 1) pulire e disinfettare i veicoli a motore prima di consentirne l'accesso all'interno della struttura;
- 2) evitare il contatto degli animali con apparecchiature di magazzino, con materiali di smaltimento, ecc.;

- 3) pulire e disinfettare immediatamente e costantemente ogni apparecchiatura/attrezzatura usata all'interno dell'allevamento;
- 4) prevedere un sistema di stanze multiple (alloggiamenti singoli o a piccoli gruppi) ciascuna dotata di un proprio sistema di ventilazione; l'aria non dovrà ricircolare e l'approvvigionamento dovrà derivare da aria fresca esterna filtrata del 100% tramite filtri HEPA e garantire più di 10 ricambi di aria/ora. Il controllo della temperatura dovrà assicurare un'oscillazione non superiore o inferiore a di 1°C all'interno della zona di termoregolazione dell'animale (per prevenire qualsiasi forma di stress), così come dovrà essere favorita la presenza di umidità relativa degli ambienti di circa il 55% +/- 10%.

#### 4.8 Struttura gestionale dell'impianto

La natura del sistema di conduzione (in particolare i criteri di accasamento utilizzati per garantire il mantenimento dello stato sanitario raggiunto e evitare l'introduzione di malattie infettive diffuse sul territorio) deve essere:

- a) basata su misure di prevenzione dietro indicazioni manageriali finalizzate;
- b) attuata attraverso l'impiego di misure di igiene che, promuovendo la salute dell'animale, mirano, in ultima analisi, al mantenimento delle capacità produttive e del benessere dell'animale stesso.

Le scrofe partoriscono individualmente in baste di parto e i suinetti vengono identificati individualmente subito dopo la nascita. I suinetti sono svezzati a circa tre settimane di età. Le scrofe in asciutta sono sistemate in sistemi individuali o in piccoli gruppi. I suinetti in allattamento o in crescita sono tenuti in piccoli gruppi in relazione alla settimana di svezzamento e mantenuti su pavimenti impermeabilizzati. L'impiego di sistemi di turnazione completa degli animali (per lotti – tutto pieno- tutto vuoto) nei locali (sale parto, sale svezzamento, ecc.) impedisce l'eventuale promiscuità di animali caratterizzati da un diverso stato sanitario. Sono da preferire locali di dimensioni ridotte per consentire che i piccoli gruppi in essi contenuti, omogenei per caratteristiche, possano essere inviati a destinazione contemporaneamente. Questo consentirà la completa disinfezione delle stanze alla fine di ogni ciclo di permanenza degli animali.

L'approvvigionamento di acqua e alimenti merita una speciale attenzione. Sono da preferire sistemi di abbeveratoi automatici che garantiscono la costante disponibilità di acqua potabile. Quest'ultima dovrà essere rifornita da fonti di accertata qualità, addizionata di cloro o eventualmente sterilizzata. L'alimento sarà formulato secondo specifici protocolli selezionati da esperti nutrizionisti. Sono da preferire diete già predisposte (più elevata qualità e ridotta possibilità di contaminazione rispetto all'impiego di cibi convenzionali) e l'alimento, preferibilmente, non dovrà contenere antibiotici. Il ricorso a fonti vegetali di proteine e la mancata aggiunta di integratori di origine animale (rigenerati o riciclati) sono fattori importanti per la prevenzione di malattie sostenute da prioni e lentivirus. Le fonti di approvvigionamento del cibo dovranno essere documentate unitamente all'impiego di farmaci (l'eventuale uso di antibiotici dovrà essere mantenuto al minimo) e additivi.

La pulizia dei locali dovrà essere prevista due volte al giorno e in maniera tale da rimuovere tutto il materiale organico presente. L'accumulo di deiezioni e un non idoneo sistema di ventilazione può risultare in un elevato livello di ammoniaca predisponente a malattie infettive dell'apparato respiratorio. Gli abbeveratoi automatici devono essere puliti periodicamente.

La movimentazione degli animali (entrata, spostamenti all'interno della struttura, uscita) dovrà essere documentata e condotta in stretto accordo con le norme di biosicurezza. L'introduzione di qualsiasi animale (comunque da limitare al massimo) che non sia nato all'interno della colonia, dovrà essere preceduta da un periodo di quarantena e da accurati accertamenti sanitari.

Il personale addetto alla manutenzione e alla cura degli animali potrà accedere allo stabulario tramite un'entrata riservata e usufruirà di servizi privati. Il passaggio ai locali di stabulazione avverrà attraverso un accesso barrierato dopo doccia e cambio di indumenti. Oltre agli addetti agli animali, potranno accedere allo stabulario solo persone debitamente autorizzate. Qualsiasi manualità sugli animali dovrà essere eseguita da personale adeguatamente addestrato. Lo staff veterinario dovrà prevedere la presenza almeno di un veterinario fisso, ufficiale, sempre disponibile, che collaborerà con specialisti nel settore dell'allevamento suino e delle malattie infettive prevalenti della specie suina. Almeno due volte l'anno sarà prevista la visita di esperti qualificati che forniranno rapporti scritti, studi dettagliati, analisi degli eventi occorsi, collezione di campioni utili per il monitoraggio di laboratorio dello stato sanitario. A tal fine saranno inoltre previste macellazioni programmate degli animali (ogni tre mesi). Gli animali che risultassero affetti da eventi patologici dovranno essere isolati (definizione di idonei programmi di quarantena) e sottoposti a indagini per escludere la presenza di agenti infettivi trasmissibili alla colonia. Prima

dell'esecuzione dello xenotrapianto gli animali dovranno essere sottoposti ad un periodo di quarantena di almeno tre settimane. Nel corso della quarantena gli animali vengono sottoposti a depistaggio individuale per la presenza di agenti infettivi. Il depistaggio dovrà essere ripetuto in caso siano trascorsi più di tre mesi dalle indagini svolte inizialmente (es. in caso di rinuncia ad effettuare lo xenotrapianto) o in caso di eventuali contatti con animali non sottoposti a quarantena.

Per lo xenotrapianto potranno essere utilizzati solo animali che siano privi di patogeni specifici. Speciale attenzione dovrà essere prestata alle condizioni di prelievo (possibilmente in sede) e trasporto del materiale da trapiantare.

Benché sia impossibile garantire l'eliminazione completa del rischio (sia individuale sia collettivo) di trasmissione di agenti infettivi attraverso la pratica di xenotrapianto, tale rischio potrà certamente essere ridotto e considerato accettabile se verranno adottate tutte le misure tecnicamente praticabili in grado di consentire la più completa analisi del rischio (definizione e gestione) stesso. (L'analisi del rischio sarà oggetto di trattazione a parte). Speciale considerazione verrà rivolta alla presenza di retrovirus endogeni.

#### **4.9 Programmi di sorveglianza e monitoraggio dello stato sanitario**

La struttura dovrà disporre di un programma ben definito e documentato di sorveglianza sanitaria (su base clinico/infettiva) dell'allevamento. Ciò comporterà la predisposizione e la messa in atto di piani in grado di garantire la sicurezza e il controllo della qualità dell'allevamento, attraverso il mantenimento dell'elevato e definito stato sanitario degli animali (in termini di applicazioni di precise norme di igiene e profilassi, di esecuzione di controlli mirati ad escludere la presenza di agenti responsabili di sindromi infettive, in particolare di zoonosi trasmissibili con la pratica di xenotrapianti). Il rischio di infezioni da funghi, parassiti, batteri, virus, prioni, può essere accettato in caso di accertata disponibilità di idonei meccanismi diagnostici e di controllo. Infezioni da parte di patogeni noti dovrebbero essere relativamente prevenibili.

I microrganismi che sono totalmente inaccettabili negli animali donatori sono quelli che:

- 1) possono potenzialmente provocare zoonosi;
- 2) possono provocare malattie nel singolo animale o in tutta la colonia.

Anche se è relativamente semplice allevare animali donatori esenti da patogeni noti, anche se apparentemente sani, gli animali possono essere portatori di patogeni sconosciuti (solo recentemente sono stati identificati nei suini due nuovi virus – uno correlato al virus dell'epatite E dell'uomo e un nuovo torovirus).

Sarà importante continuare a identificare nuovi microrganismi e a sviluppare tecniche diagnostiche specifiche per il depistaggio e la diagnosi di patogeni potenziali associati con gli animali donatori.

Dovranno essere previsti meccanismi e protocolli dettagliati per il controllo qualità nella produzione di organi, tessuti e cellule per xenotrapianti.

Tali protocolli e meccanismi saranno diretti a:

- a) identificare e sviluppare animali donatori che hanno il potenziale di produrre cellule, tessuti ed organi della migliore qualità possibile;
- b) eliminare agenti xeno-zoonotici dagli animali donatori;
- c) prevenire l'esposizione degli animali donatori ad agenti infettivi inaccettabili per xenotrapianti;
- d) incoraggiare lo sviluppo e l'uso di programmi dettagliati di sorveglianza dello stato di salute degli animali donatori;
- e) incoraggiare la pratica dello studio clinico approfondito di qualsiasi problema di salute che possa verificarsi nell'allevamento e l'uso di procedure diagnostiche appropriate;
- f) garantire il più alto grado di sicurezza possibile nell'uso di cellule, tessuti e gli organi suini utilizzati nei xenotrapianti.

Parte integrante del programma di controllo qualità precedentemente accennato sarà rappresentata dallo sviluppo e dall'adozione di un programma che miri ad assicurare un perfetto stato di salute degli animali donatori. Parte del programma sarà la verifica negli animali donatori della presenza di agenti infettivi potenzialmente rilevanti per l'uso degli stessi nei xenotrapianti.

Si dovrà considerare:

- a) la rilevanza degli agenti infettivi nel contesto di protocolli e usi specifici;
- b) l'adozione di criteri per sviluppare liste di esclusione di agenti xeno-zoonotici;
- c) il ricorso a conoscenze multidisciplinari per lo sviluppo e la valutazione di protocolli di "salute totale" per gli animali;
- d) la necessità di un costante riesame di tutti gli aspetti del programma ed il suo aggiornamento sulla base delle conoscenze più recenti.

Il monitoraggio microbico, istopatologico e sierologico dovrà essere effettuato su base periodica:

- a) sulla colonia di animali donatori, ad es. secondo il seguente protocollo:
- isolare gli animali in gruppi
  - effettuare su animali sentinella il monitoraggio su base periodica ( 2-3 volte l'anno, a seconda del numero di animali dell'allevamento: delle condizioni di stabulazione, dello stato sanitario iniziale degli animali fondatori della colonia);
  - verificare nelle persone che vengono a contatto diretto con gli animali donatori la presenza di agenti infettivi potenzialmente dannosi per la colonia.

#### 4.10 Criteri per il depistaggio nei confronti di agenti infettivi noti

Gli animali donatori devono risultare clinicamente e fisiologicamente sani , non mostrare alcun segno di malattia conclamata e esenti da agenti infettivi:

- 1) noti, causa primaria di zoonosi (anche quelli estranei al contesto dello xenotrapianto, es. virus della rabbia);
- 2) che potrebbero essere causa di zoonosi in conseguenza :
  - della diretta esposizione a particolari tessuti in caso di xenotrapianto;
  - dello stato di immunodepressione del paziente sottoposto a xenotrapianto (es. T. gondii);
  - di alterazioni provocate all'interno del paziente sottoposto a xenotrapianto (es. chimerismo);
  - della similarità con patogeni umani (es. cytomegalovirus, adenovirus, ecc.);
- 3) organo-specifici (es. Mycoplasma spp. nel caso di trapianto di polmone);
- 4) di origine umana (es. morbillo, rosolia, ecc.);
  - che normalmente non vengono considerati agenti di zoonosi , ma la cui trasmissione può essere ottenuta con la pratica dello xenotrapianto (es. Hepatocystis kockii);
  - caratterizzati da elevato potere di mutazione o ricombinazione ( virus dell'influenza, rotavirus, parvovirus, ecc.);
  - riconosciuti resistenti, non sensibili o refrattari a trattamenti terapeutici o per i quali non siano stati definiti idonei trattamenti terapeutici (es. batteri antibiotico resistenti, parassiti refrattari ai farmaci, ecc.);
  - di rilevanza geografica per il paese di origine degli animali (agenti endemici o considerati esotici per un'area, ecc., sia per animali domestici sia selvatici, es. virus della peste suina africana, malattie vescicolari, ecc.)
  - appena scoperti (qualora tecnicamente possibile e prima ancora che ne venga definito il potenziale di patogenicità e di trasmissione e se ne possa definire il rischio per la salute pubblica).

Le metodologie utilizzate per il depistaggio degli agenti infettivi nella colonia, nel singolo animale donatore, nel materiale da trapiantare, dovranno essere descritte nel protocollo clinico predisposto per ciascun tipo di intervento di xenotrapianto. I protocolli dovranno essere sottoposti all'esame e ottenere l'approvazione delle Commissioni designate. Dovranno essere utilizzati saggi standard, di carattere generale e specifici. Esami microbiologici dovranno essere eseguiti su campioni di feci (flocculazione, esame batterioscopico diretto, esame colturale) e di sangue (esame colturale, striscio su vetrino) degli animali sottoposti a isolamento prima del trapianto, unitamente a saggi virologici e sierologici specifici tesi a escludere la presenza di virus o anticorpi nei confronti della più completa lista di agenti infettivi (vedasi quella stilata per una preliminare valutazione del rischio). Dovrà essere condotto un esame autoptico completo degli animali donatori, per escludere alterazioni macroscopiche. Campioni di tessuti (epatico, renale, polmonare, cardiaco, cerebrale, ecc. ) dovranno essere sottoposti a esame istologico per escludere alterazioni microscopiche. Campioni analoghi dovranno essere conservati in paraffina o congelati per un tempo pari al periodo di osservazione dei pazienti trattati con il materiale biologico proveniente dallo stesso animale. Dovranno essere eseguiti opportuni saggi batteriologici (prove di sterilità batterica e micotica, assenza di micoplasmi) e virologici secondo le indicazioni previste dalla Farmacopea Italiana e Europea per il controllo di vaccini vivi attenuati per uso umano e veterinario (prodotti biologici). In particolare, dovranno essere eseguiti saggi di:

- co-coltivazione su substrati cellulari permissivi alla replicazione di virus suini e umani (es. PK, ST, VERO, MRC-5); osservazione della comparsa di effetto citopatico;
- inoculazione del sovrinatante cellulare in cavità allantoidea di uova embrionate, per escludere la presenza di virus emagglutinanti;
- trascrittasi inversa;
- di amplificazione di sequenze retrovirali per mezzo di tecniche di reazione a catena della polimerasi (PCR) utilizzando "primers" specifici per i retrovirus suini noti (PERV A, PERV B).

Dovranno essere eseguiti saggi che includono una serie di substrati cellulari appropriati (incluse PBMC) in grado di amplificare e identificare retrovirus endogeni nel materiale da trapiantare ed altri virus xenogenici in grado di produrre infezione nell'uomo. La scelta delle cellule indicatori nel saggio dovrebbe essere determinata sulla base del tessuto da trapiantare e sulle sue applicazioni cliniche. Per esempio, uno xenotrapianto che coinvolga il sistema nervoso centrale richiede saggi di co-coltura di cellule del tessuto da trapiantare con quelle di un linea cellulare neuronale al fine di identificare eventuali virus neurotropici. Sono consigliati anche passaggi seriali per l'identificazione di effetti citopatici, formazione di foci, saggi di trascrittasi inversa e microscopia elettronica. Quando la coltura suggerisce la presenza di agenti virali, saggi immunologici o genetici (saggi immunoenzimatici per l'identificazione di reattività sierologica incrociata, immunofluorescenza o saggi simili, Southern blot, saggi PCR e PCR-trascrittasi inversa) o tecniche di coltura in vivo a specie incrociate, potrebbero essere utili. L'identificazione di virus latenti può essere facilitata attivandoli con metodi chimici o irradiandoli. Per l'identificazione di batteri sono invece disponibili sonde PCR universali, consigliate anche nella fase di screening del materiale biologico da trapiantare. In considerazione del rapido evolversi delle tecniche virologiche e biomolecolari, potrà essere utilizzata, in futuro, qualsiasi tecnica risultasse più idonea di quelle proposte attualmente. Dovranno essere eseguiti saggi sierologici e virologici di depistaggio dei lavoratori addetti agli animali, in particolare:

**1. Saggi sierologici:**

- Virus dell'epatite A, B, C
- Morbillo
- Parotite
- Rosolia
- Epstein-Barr
- Herpes simplex
- Histoplasma capsulatum
- Varicella zoster
- Cytomegalovirus
- Toxoplasma gondii
- HIV 1, 2

**2. Saggi virologici**

- Influenza suina
- Cytomegalovirus del suino
- Rotavirus suino
- TGE

Dovrà essere eseguito inoltre lo "skin test" per il Myc. Tuberculosis.

## 5. RICERCHE DI BASE

*Linea guida relative ai criteri di sicurezza ed ai controlli di qualità per gli studi clinici sperimentali che prevedono l'utilizzo di cellule xenogeniche "estensivamente manipolate" nonché ai criteri di accreditamento delle strutture in cui tali manipolazioni hanno luogo.*

### 5.1 Introduzione

Le ricerche di base possono rappresentare un rischio in termini di trasmissione di patogeni da una specie ad un'altra. Il passaggio "in vitro" di un virus da cellule di una specie a cellule di una specie diversa può rappresentare un problema da non sottovalutare se le condizioni sperimentali, protezione dell'operatore e protezione dell'ambiente ad esempio, non sono più che ideali.

Tutte quelle ricerche in cui si utilizzino materiali non umani infetti o potenzialmente infetti dovrebbero essere svolte in laboratori di strutture accreditate, in condizioni di sicurezza, dovrebbero essere definite le modalità di smaltimento dei prodotti utilizzati nella sperimentazione, il personale esposto o coinvolto nella sperimentazione dovrebbe essere monitorato etc.

### 5.2 Accreditamento delle strutture e notifica di attività

Come "strutture" si intendono gruppi di persone organizzate in modo tale che possano essere identificati alcuni ruoli chiave ed operanti all'interno di locali destinati alle attività per le quali le strutture sono state create. Queste strutture possono essere dedicate sia all'intero processo (prelievo, manipolazione ed utilizzo), sia ad una singola fase del processo. E' necessario che le strutture siano accreditate e pertanto che appropriate regole vengano stabilite per

- l'identificazione dei responsabili della struttura,
- le caratteristiche dei locali e delle attrezzature
- l'identificazione dell'Ente Ispettore e di quello Accreditante (Ministero della Sanità)

A queste regole sono sottoposte tutte le strutture che effettuino prelievi, manipolazione ed utilizzo a scopo terapeutico di cellule o tessuti anche se senza scopo di lucro. Nel caso delle strutture destinate al prelievo e/o all'utilizzo delle cellule e dei tessuti la segnalazione dovrà essere fatta anche alle strutture dedicate alla manipolazione.

Nel caso di nuove tecnologie, applicazioni o processi produttivi, o comunque nei casi in cui non esista sufficiente documentazione o esperienza consolidata di utilizzo clinico, sarà necessario sottoporre alla stessa autorità anche la documentazione relativa alla sperimentazione preclinica che ne indichi il grado di sicurezza.

#### 5.2.1 Identificazione dei responsabili della struttura

Per tutte le strutture occorre identificare un responsabile legale ed un responsabile scientifico/clinico.

Nel caso di strutture dove si effettuano manipolazioni di cellule, oltre all'identificazione di un responsabile scientifico, occorre prevedere la presenza di un responsabile del controllo di qualità. Queste ultime figure professionali sono necessariamente separate fra di loro. In particolare il responsabile scientifico deve essere laureato nel settore biomedico, e avere una provata esperienza scientifica nel campo specifico.

Solo nel caso di laboratori di ricerca che effettuino un numero limitato di interventi terapeutici nel corso di un anno solare, le figure professionali del responsabile scientifico e del responsabile del controllo di qualità possono essere cumulate nel responsabile della ricerca e della struttura.

#### 5.2.2 Caratteristiche dei locali e delle attrezzature per la manipolazione delle cellule e dei tessuti

In considerazione delle caratteristiche tecnologiche dei processi di manipolazione delle cellule e dei tessuti, le strutture fisiche, includendo edifici ed apparecchiature, dovranno essere chiaramente identificate ed essere in grado di garantire la sicurezza e la qualità finale del prodotto. Le strutture fisiche devono essere adeguate allo scopo di garantire la sicurezza del paziente, del donatore e degli operatori. Di seguito vengono indicati i requisiti di carattere generale delle strutture fisiche. Altri requisiti potranno dipendere dal tipo di tessuto e di operazione che si intende effettuare.

### Requisiti delle strutture

In assenza di una normativa specifica, quadro di riferimento generale devono essere considerate le norme GLP e, per aspetti specifici GMP e ISO9002.

In tutti i casi dovranno essere seguite le indicazioni seguenti:

- Tutti i tessuti e le coltivazioni cellulari che ne risultano devono essere lavorate in modo asettico utilizzando materiali e strumenti sterili.

- I locali dove si processano i prelievi e si coltivano le cellule per trapianto devono essere di tipo BL3 (circolazione di aria autonoma, flusso, temperatura ed umidità controllati, filtri assoluti, etc.)

- Tutti i locali BL3 devono essere indipendenti e sterilizzabili all'occorrenza.

- Le cellule destinate all'utilizzo clinico dovranno essere coltivate in locali adibiti esclusivamente a tale uso. Nel caso di laboratori di ricerca che effettuino un numero limitato di interventi terapeutici concentrati in un periodo di tempo limitato, il diverso utilizzo dei locali destinati alla coltura di cellule per uso clinico può essere consentito a condizione che siano identificate e validate procedure di sanitizzazione delle strutture prima di un nuovo impiego per colture di cellule ad uso terapeutico.

- Nei locali destinati alle colture di cellule per utilizzo clinico dovranno essere garantite condizioni tali da impedire contaminazioni crociate fra cellule di origine diversa (separazione fisica e/o temporale delle diverse colture).

- Gli apparecchi di particolare rilevanza per il mantenimento della qualità delle colture devono essere dotati di allarme (es.: congelatori, incubatori, cappe a flusso laminare, impianto per la CO<sub>2</sub>, impianto per l'azoto liquido).

- Un sistema di assicurazione di qualità verifica tra l'altro le certificazioni sui materiali in entrata e le caratteristiche dei materiali in uscita, garantisce l'assenza di contaminazioni, virali e batteriche, e soprattutto di cross-contaminazioni crociate tra diversi donatori.

- Viene garantita la completa rintracciabilità di ogni lotto di materiale prodotto (ogni donatore è identificato da un numero di lotto). Le procedure di etichettatura di tutto il materiale (biopsie, fiasche di coltura, contenitori per le cellule pronte per la spedizione, etc.) sono critiche e devono essere condotte con ogni cura.

- La struttura deve prevedere l'addestramento del personale coinvolto.

In tutti i casi, le strutture dovranno richiedere l'accreditamento.

#### *5.2.3 Caratteristiche dei locali e delle attrezzature per il prelievo e/o l'utilizzo delle cellule e dei tessuti*

Le strutture dovranno essere in grado di garantire le normali condizioni di sterilità e sicurezza previste dall'attuale normativa nel caso di prelievi e di interventi chirurgici.

Le strutture dovranno richiedere l'accreditamento per ciascuno degli utilizzi specifici.

#### *5.2.4 Identificazione dell'Ente Ispettore e di quello Accreditante*

In considerazione delle operazioni che si intendono svolgere in queste strutture e data la necessità di un criterio omogeneo su tutto il territorio nazionale e nei rapporti con enti o individui di altre nazioni l'Ente Accreditante dovrebbe essere il Ministero della Sanità che può delegare per l'attività ispettiva un'entità di natura diversa.

#### *5.2.5 Notifiche per le strutture che effettuano manipolazioni in vitro*

Nel caso di manipolazioni estensive o di manipolazioni minime per finalità d'uso xenogenico una notifica che includa tutti i protocolli che si intendono utilizzare, la descrizione dettagliata delle strutture fisiche e delle procedure di sicurezza, unitamente ad un elenco del personale con le informazioni riguardanti la preparazione per i compiti specifici, deve essere fornita al Ministero della Sanità. Sarà compito del Ministero della Sanità disporre, se necessario ed entro un limite di tempo prefissato, una verifica degli impianti e del personale ed una valutazione dei protocolli presentati.

E' auspicabile che venga stabilito per ogni tessuto e/o procedura delle caratteristiche di riferimento che rappresentino lo stato dell'arte e che permettano una valutazione rapida della fattibilità e commerciabilità del prodotto cellulare o tessutale proposto.

Il Ministro della Sanità dovrebbe provvedere a rendere pubblico annualmente un elenco delle strutture accreditate a questo fine.

Qualsiasi modifica che non sia di pura sostituzione fra apparati, o reagenti analoghi, ma significhi una modificazione sostanziale delle procedure utilizzate deve essere notificata al Ministero della Sanità prima della

messa in atto. I cambiamenti si ritengono approvati se entro un periodo di tempo limitato e prefissato non viene fatta alcuna comunicazione a riguardo da parte del Ministero della Sanità. Se del caso, dovrà essere ripetuta la dimostrazione dell'efficacia del prodotto ottenuto.

## 5.3 Controllo di qualità

### 5.3.1 Criteri generali

Nel caso di cellule e tessuti manipolati in vitro, l'obiettivo da raggiungere nel controllo dei processi di produzione e della qualità del prodotto finale è quello di garantire la sicurezza e l'efficacia dei prodotti da immettere nell'uso clinico permettendo allo stesso tempo che lo sviluppo e l'innovazione tecnologica nel settore possa procedere senza l'aggravio di regolamentazioni eccessivamente complesse o non necessarie.

Il livello di controllo che è ragionevole prospettare è variabile e dipende dal rischio che le cellule/tessuti

- Siano o vengano contaminate da agenti biologici potenzialmente dannosi per il ricevente
- perdano, durante il processo di manipolazione, tutte o parte delle caratteristiche funzionali o strutturali richieste per l'utilizzo specifico
- acquistino, durante il processo di manipolazione, caratteristiche indesiderate (es.: trasformazione neoplastica).

Il livello di rischio finale è dipendente dai seguenti fattori, che identificano diversi livelli di rischio specifico per i quali è necessario applicare diversi standard di controllo di qualità di processo e di prodotto:

- manipolazione: va operata una distinzione in base al grado di manipolazione e trattamento cui vengono sottoposte le cellule/tessuti tra il prelievo e l'utilizzo finale nel paziente, distinguendo tra materiale non trattato o minimamente manipolato dal materiale manipolato estensivamente;
- conservazione: va distinto il caso in cui le cellule/tessuti vengono impiegate direttamente o a breve distanza dal prelievo da quello in cui vengono conservate, spedite o trattate in banche o strutture in cui vengono conservate o trattate cellule da donatori differenti;

### 5.3.2 Controllo di qualità del processo produttivo

#### Origine delle cellule/tessuti.

L'origine anatomica, l'identità tissutale o cellulare e altre informazioni rilevanti per l'identificazione dovrebbero essere descritte. Queste includono le caratteristiche dell'animale donatore, la sua provenienza, certificazione di analisi microbiologiche adeguate alla specie animale in questione etc.

### 5.3.3 Coltura, espansione e/o ingegnerizzazione delle cellule in vitro

I materiali e i reagenti utilizzati nel processo di produzione (materiale plastico, terreni di coltura, fattori di crescita, citochine, anticorpi, etc.) dovranno essere dotati di certificazione per uso clinico. Per tutti i materiali non disponibili con questo tipo di standard, dovrebbe essere prodotta documentazione che ne attesti l'idoneità all'utilizzo. Nel caso dei materiali, dovrebbero essere garantite sterilità, apirogenicità e assenza di contaminanti chimici, biologici e da agenti avventizi. Nel caso dei reagenti, e per ogni lotto usato, andrebbe fornita identificazione del produttore e del lotto, data di produzione, di acquisto e di scadenza, composizione chimica, grado di purezza, attività biologica, livello e natura dei contaminanti noti, assenza di contaminazione da agenti avventizi (virus, batteri, lieviti, funghi, micoplasmi) e grado di pirogenicità. Dovrebbe inoltre essere tenuto un registro che permetta di risalire, per ogni campione processato, a tutti i materiali e i reagenti utilizzati durante il processo di produzione.

Mezzi di coltura o sostanze che possano indurre sensibilizzazione o reazioni immunitarie, quali sieri animali, proteine del siero, penicilline o altri antibiotici beta-lattamici ed antimicotici, dovrebbero essere evitati o limitati alle prime fasi di manipolazione/coltura, e dovrebbero essere comunque assenti nel prodotto finale.

### 5.3.4 Controllo di qualità del prodotto

Durante l'espansione in vitro, le cellule sono esposte ad una varietà di rischi biologici che dovranno essere analizzati accuratamente a varie fasi dell'espansione e obbligatoriamente prima dell'eventuale reintroduzione delle cellule nel paziente. Questi rischi includono:

- Contaminazione da agenti avventizi (provenienti dall'ambiente e/o dai mezzi di coltura) quali virus, batteri, micoplasmi, miceti e lieviti. Nei limiti del ragionevole, la presenza di ogni possibile agente patogeno deve essere verificata periodicamente con ogni mezzo diagnostico commercialmente disponibile.

- Senescenza. Cellule primarie sono capaci di un limitato numero di divisioni cellulari in coltura, al termine delle quali, entrano in una fase di senescenza. In questo caso le cellule non soltanto non sono capaci di ulteriori divisioni, anche se stimolate opportunamente, ma spesso non sono nemmeno più capaci di svolgere le funzioni differenziate proprie del tessuto di appartenenza. Il raggiungimento della senescenza in vitro nella maggior parte della popolazione cellulare renderebbe l'utilizzo di dette cellule per lo meno inutile. Conseguentemente sarà necessario misurare il numero medio di divisioni cellulari di una data popolazione cellulare a partire dall'espianto, includendo i passaggi precedenti e successivi ad un'eventuale criopreservazione. Sarà inoltre necessario utilizzare le cellule entro un limite di passaggi in vitro che garantisca il mantenimento di una sufficiente residua capacità proliferativa in vivo. Nel caso di popolazioni che contengano cellule staminali, la capacità di automantenimento e di produrre progenitori maturi dovrà essere verificata durante l'espansione in coltura.

- Alterazioni del corredo cromosomico. La coltivazione prolungata di cellule di mammifero normali aumenta la probabilità di insorgenza di anomalie quantitative e qualitative del corredo cromosomico. Tale evenienza dovrebbe essere verificata mediante analisi del cariotipo, da effettuarsi con criteri in uso per la diagnosi prenatale di anomalie cromosomiche.

- Perdita del fenotipo differenziato. Durante la coltivazione in vitro, alcuni tipi cellulari possono perdere, in parte o totalmente, la capacità di esprimere i prodotti genici tipici del tessuto di appartenenza. Questo potrebbe compromettere sia la possibilità delle cellule di reintegrarsi nel tessuto d'origine, sia la capacità di svolgere in vivo la nuova funzione eventualmente acquisita durante la manipolazione in vitro. Ciò dovrà essere verificato attraverso analisi immunocitochimica mediante anticorpi specifici per prodotti genici del tessuto in questione (esempio cheratine per epitelii). Esiste inoltre la possibilità che una popolazione cellulare contaminante, presente in piccola proporzione al momento dell'espianto in coltura, possa proliferare più rapidamente e quindi sostituire progressivamente la popolazione cellulare che si intende manipolare. Anche in questo caso, la diversa proporzione di popolazioni eterogenee, dovrà essere analizzata quantitativamente mediante analisi immunocitochimica per marcatori specifici delle diverse popolazioni cellulari.

- Insorgenza di fenotipo neoplastico. Benché trasformazione neoplastica spontanea sia un fenomeno raro nei mammiferi, l'esposizione di cellule ad agenti potenzialmente patogeni, quali farmaci o sostanze chimiche, ormoni e fattori di crescita o vettori virali e non, potrebbe aumentare questo rischio. Ciò dovrà essere verificato prima dell'utilizzo delle cellule in vivo e/o della criopreservazione mediante saggio di crescita in adeguato terreno di coltura e, in caso di risultati positivi o dubbi, mediante saggio di crescita in animali immunodeficienti.

I punti precedenti dovranno essere attentamente considerati in fase di validazione del processo. Successivamente l'assenza di agenti avventizi ed il numero di divisioni cellulari effettuate dovranno essere determinati per ogni coltura. La presenza delle cellule staminali, le eventuali alterazioni del corredo cromosomico, il mantenimento del fenotipo desiderato e l'assenza di un fenotipo neoplastico dovranno essere controllati, quando applicabile, periodicamente e/o a campione.

### 5.3.5 Crioconservazione

A seconda della necessità operativa, una coltura cellulare può essere crioconservata a diversi passaggi. Quando una coltura cellulare viene crioconservata, preferibilmente il congelamento dovrebbe essere effettuato con cellule ai primi passaggi della coltura.

Il protocollo di crioconservazione indicherà:

- composizione della soluzione crioconservante

(sono utilizzabili agenti crioprotettivi diversi. E' in tutti i casi essenziale che il crioprotettore sia facilmente allontanabile una volta terminato il compito crioprotettivo, abbia bassa tossicità alle concentrazioni utilizzate e sia completamente privo di ogni effetto mutageno)

- le modalità di raggiungimento della temperatura di conservazione

(solitamente il decremento graduale e costante della temperatura fino a -80°C, prima del trasferimento in azoto liquido, consente un più efficace ripristino della capacità vitale cellulare dopo scongelamento)

- la temperatura di mantenimento

(il mantenimento della temperatura di crioconservazione deve essere garantito da congelatori a -80°C e/o da bidoni di azoto liquido -196°C provvisti di allarme. Gruppi di continuità o sistemi con CO<sub>2</sub> garantiranno la costante temperatura dei congelatori -80°C qualora, in assenza del personale, si determinasse un'assenza di energia elettrica)

- i tempi di conservazione

(i tempi massimi di conservazione dovranno essere determinati per ciascun tipo cellulare e tessuto)

- le modalità e i tempi di scongelamento.

(generalmente l'azione citotossica dei crioconservanti a temperatura ambiente impone l'adozione di tempi rapidissimi per la fase di scongelamento)

Nel protocollo saranno anche reperibili tutte le informazioni su:

- la vitalità a breve termine e a lungo termine delle cellule o dei tessuti dopo lo scongelamento
- i controlli da eseguire per verificare il mantenimento della vitalità.

### Sterilità

Ogni fase del processo di crioconservazione deve svolgersi in modo sterile.

### Confezione ed etichettatura

Le cellule ed i tessuti vengono congelati, conservati in ampolle e contenitori ermeticamente chiusi di materiale sterile, non permeabile a gas e vapori e non tossico per le cellule contenute, né prima né dopo la sterilizzazione, né a seguito di eventuale termosaldatura.

L'etichettatura sulla confezione deve contenere tutti i dati necessari alla identificazione e corretto utilizzo del campione. Ad esempio:

- numero della preparazione
- numero di lotto dell'animale donatore
- data di congelamento
- scadenza del preparato
- temperatura di conservazione
- sigla del produttore

Soprattutto nel caso di un'attività su larga scala è auspicabile l'utilizzo di codifiche mediante codice a barre.

### *5.3.6 Banche per la conservazione di cellule e tessuti*

Le ampolle di cellule e/o i contenitori dei tessuti devono essere conservati in contenitori di azoto liquido o in congelatori dedicati. La posizione, l'identità e un inventario delle singole ampolle di cellule e/o dei contenitori dei tessuti devono essere disponibili.

Deve essere attivata una procedura mirata con la quale si controlla che la temperatura di conservazione nell'azoto liquido (temperature tra -180°C e -130°C) e nel congelatore (temperature tra -70°C e -85°C) rimanga costante.

## **5.4 Origine dei materiali**

### *5.4.1 Origine dei materiali da utilizzare per colture cellulari*

I terreni che vengono a contatto con cellule o tessuti devono essere idonei alle colture cellulari, certificati per la loro composizione, qualità, contenuto in sali, aminoacidi e altri componenti rilevanti e provvisti di una scadenza definita. Analogamente, i materiali plastici utilizzati per colture di tessuti, così come i biomateriali con i quali le cellule siano eventualmente associate, devono essere certificati.

Particolare attenzione deve essere posta al siero (fetale bovino o, in genere, di origine non umana), se utilizzato, a causa delle patologie encefaliche trasmissibili (TSE). Idonea certificazione e conformità con le normative vigenti devono essere ottenute dall'utilizzatore e associate alla documentazione del lotto di materiale prodotto con quel particolare lotto di siero.

### *5.4.2 Origine di tutti gli altri reagenti*

Tutti gli altri reagenti comuni devono essere certificati dal produttore per i parametri previsti o devono essere certificati dal laboratorio di controllo di qualità dell'utilizzatore secondo una procedura definita e codificata.

### *5.4.3 Tecnica di prelievo e trasporto*

La biopsia dovrà essere eseguita secondo le norme della sala operatoria.

La biopsia deve essere trasportata in una soluzione sterile, privilegiando, quando possibile, l'uso di terreni di coltura con massimo apporto nutrizionale. Il contenitore per il trasporto deve essere chiuso ermeticamente e deve

permettere una conservazione sterile ad una temperatura appropriata. In attesa della lavorazione, la biopsia viene conservata alla stessa temperatura.

## 6. PROPOSTE OPERATIVE

Attualmente, in Italia non esiste una normativa che regoli la sperimentazione clinica dello xenotrapianto.

E' quindi auspicabile ed opportuno a livello nazionale, ed eventualmente a livello europeo, definire una normativa specifica ed unitaria che regoli la fase sperimentale dell'impiego di cellule e tessuti da specie diverse da quella umana a scopo di trapianto nell'uomo.

Le linee guida, che il gruppo di lavoro ha elaborato, intendono suggerire una possibile normativa che regoli in Italia la sperimentazione clinica dello xenotrapianto, oltre che definire norme tecniche di supporto ai criteri autorizzativi. Tali norme, riportate ai punti 2, 3, 4 e 5 del presente documento, vogliono definire:

- a) *criteri di sicurezza e di efficacia dell'applicazione clinica dello xenotrapianto*
- b) *controlli di qualità per gli studi clinici sperimentali*
- c) *criteri di accreditamento delle strutture sede della sperimentazione clinica degli xenotrapianto*
- d) *criteri di monitoraggio sanitario e qualificazione del personale esposto a possibili rischi professionali derivanti dall'impiego dello xenotrapianto.*

Per rispondere a tutte le esigenze che una sperimentazione clinica dello xenotrapianto comporta, e analogamente a quanto avviene in altri Paesi Europei, il gruppo di lavoro suggerisce:

1. L'istituzione di una Commissione Centrale
2. L'istituzione di un Registro Centralizzato e Registri Periferici
3. L'istituzione di una Biobanca Centralizzata e Biobanche Periferiche
4. Il monitoraggio sanitario del personale esposto professionalmente: operatori sanitari, operatori veterinari, lavoratori degli allevamenti etc.
5. Un programma di qualificazione e riqualificazione periodica professionale del personale coinvolto nella sperimentazione.
6. L'aggiornamento delle norme in base ai risultati e ai progressi scientifici.

E' necessario che la Commissione Centrale, il Registro Centralizzato e la Biobanca Centralizzata siano finanziati con fondi pubblici.

## 7. COMMISSIONE XENOTRAPIANTI

La Commissione e' istituita dal Ministro della Sanita' ed ha sede presso il Ministero della Sanita'. Partecipano alla Commissione i rappresentanti dei Ministeri Competenti ed un limitato numero di esperti fra i quali, indicativamente, dovrebbero essere previste le seguenti competenze:

2. Clinica
3. Chirurgica (trapiantologica)
4. Virologica
5. Microbiologica
6. Veterinaria
7. Bioetica
8. Psicologica
9. Infettivologica
10. Immunologica
11. Biologica
12. Biotecnologica

Compiti della Commissione sono:

1. Accreditamento delle strutture sede di sperimentazione, ivi compresi gli allevamenti degli animali
2. Autorizzazione dei protocolli sperimentali proposti e già approvati dai comitati etici locali. Le sperimentazioni possono iniziare previa autorizzazione scritta da parte della Commissione. Vanno notificati alla Commissione tutti i problemi e inconvenienti che dovessero insorgere nel corso della sperimentazione.

3. Valutazione dei risultati ottenuti,
4. Controllo di Registri e Biobanche

La Commissione può avvalersi all'occorrenza di esperti con competenze specifiche che possano essere consultati sulla base di necessità contingenti.

La Commissione inoltre identifica misure di prevenzione e contenimento da adottare di fronte ad eventuali episodi di zoonosi che dovessero verificarsi nel paziente, nei sanitari esposti, nei familiari, nella popolazione.

I pareri espressi dalla commissione dovrebbero essere resi pubblici e costituire precedente.

## **8. REGISTRO CENTRALIZZATO XENOTRAPIANTI**

Presso l'Istituto Superiore di Sanità viene istituito il Registro Centralizzato Xenotrapianti, gestito da personale con specifiche competenze (informatiche, statistico-epidemiologiche, veterinarie, mediche, biologiche etc).

I compiti principali del Registro:

1. La raccolta dei dati biologici, clinici e personali di animali, pazienti ed operatori professionalmente coinvolti ed esposti a possibili rischi professionali derivanti dall'impiego dello xenotrapianto
2. Le indagini epidemiologiche
3. Le analisi statistiche
4. Il monitoraggio e valutazione dei risultati e degli eventuali sviluppi delle sperimentazioni cliniche

Al Registro Centralizzato devono affluire i dati raccolti dai singoli Registri Periferici mantenuti e gestiti dai Centri sede di sperimentazione.

L'Istituto Superiore di Sanità provvede alla trasmissione all'ISPESL dei dati relativi agli operatori sanitari professionalmente esposti.

## **9. BIOBANCA CENTRALIZZATA XENOTRAPIANTI**

Presso l'Istituto Superiore di Sanità viene istituita la Biobanca Centralizzata Xenotrapianti. La Biobanca, con sede in locali idonei e dotata di strutture adeguate, è curata da personale che abbia specifica competenza e preparazione riguardo alla manipolazione e la crio-conservazione di campioni biologici, analisi istologica, microbiologica classica e molecolare etc.

I compiti principali della Biobanca sono:

1. La raccolta e conservazione di campioni biologici (campioni di tessuti, cellule, liquidi biologici) di animali, pazienti e loro conviventi, ed operatori coinvolti nelle singole sperimentazioni cliniche.
2. Le analisi microbiologiche dei campioni raccolti
3. Le analisi biologiche e molecolari dei campioni raccolti
4. L'eventuale analisi istologica ed anatomopatologica.

Alla Biobanca Centralizzata devono corrispondere Banche Periferiche (regionali o locali) in riferimento alle strutture accreditate che abbiano fatto richiesta di autorizzazione a studi clinici sperimentali.

L'invio dei campioni biologici (in doppio alla banca locale e centrale) deve considerarsi obbligatorio da parte dei centri in cui avviene la sperimentazione.

L'Istituto Superiore di Sanità può avvalersi di strutture esterne tramite opportune convenzioni.

## **10. MONITORAGGIO SANITARIO E QUALIFICAZIONE DEL PERSONALE PROFESSIONALMENTE ESPOSTO AL RISCHIO DELLO XENOTRAPIANTO**

Tutte le istituzioni coinvolte a qualunque titolo nella sperimentazione devono curare il monitoraggio sanitario del personale esposto professionalmente ed istituire corsi permanenti di preparazione ed aggiornamento del personale esposto al rischio fisico-biologico.