

5.2.8 MINIMALIZACE RIZIKA PŘENOSU AGENS ZVÍŘECÍ SPONGIFORMNÍ ENCEFALOPATIE HUMÁNNÍMI A VETERINÁRNÍMI LÉČIVÝMI PŘÍPRAVKY

Synonymum. Minimalizace rizika přenosu původců zvířecí spongiformní encefalopatie humánními a veterinárními léčivými přípravky

7.4:50208

Tato obecná stať je identická s „Pokyny pro minimalizaci rizika přenosu původců zvířecí spongiformní encefalopatie prostřednictvím humánních a veterinárních léčivých přípravků – revize 3 (EMA/410/01 rev. 3)“.

Obsah

- 1 Úvod
- 1-1 Vědecké zdůvodnění
- 1-2 Shoda předpisů
- 2 Rozsah obecné stati
- 3 Obecné úvahy
 - 3-1 Vědecké zásady pro minimalizaci rizika
 - 3-2 Zvířata jako zdroj
 - 3-2-1 Geografický původ zdroje
 - 3-2-1-1 Bovinní materiál
 - 3-2-1-2 Ovce a kozy (malí přežvýkavci)
 - 3-2-2 Stáda skotu (uzavřená) se zanedbatelným rizikem BSE
 - 3-3 Části zvířecích těl, tělní tekutiny a sekrety jako výchozí materiály
 - 3-4 Stáří zvířat
 - 3-5 Výrobní postup
- 4 Posouzení rizik u materiálů nebo látek použitých při výrobě a přípravě léčivého přípravku v souvislosti s dodržováním právních předpisů
- 5 Hodnocení přínosu/rizika
- 6 Specifické rozvahy
 - 6-1 Kolagen
 - 6-2 Želatina
 - 6-3 Bovinní krev a krevní deriváty
 - 6-4 Deriváty loje

6-5 Živočišné uhlí

6-6 Mléko a deriváty mléka

6-7 Deriváty vlny

6-8 Aminokyseliny

6-9 Peptony

1 ÚVOD

1-1 VĚDECKÉ ZDŮVODNĚNÍ

Přenosné spongiformní encefalopatie (TSE) jsou chronická degenerativní nervová onemocnění, charakterizovaná nahromaděním abnormální izoformy buněčného glykoproteínu, známého pod označením PrP (nebo bílkovina prionu). Abnormální izoforma PrP (PrP^{TSE}) se liší od normálního PrP (PrP^c) tím, že je vysoce rezistentní k protease a k denaturaci teplem. PrP^{TSE} se považuje za infekční agens zodpovědné za přenos choroby TSE.

Přenosné spongiformní encefalopatie (TSE) zahrnují:

- bovinní spongiformní encefalopatii (BSE) u skotu;
- klusavku (scrapie) u ovcí a koz;
- chronické chřadnutí (chronic wasting disease – CWD) u jelenovitých (jelenů a losů);
- přenosnou encefalopatii norka (transmissible mink encephalopathy – TME) u norků chovaných na farmách;
- spongiformní encefalopatii koček (feline spongiform encephalopathy – FSE) u kočkovitých (specificky u domácích koček a velkých koček chovaných v zajetí);
- spongiformní encefalopatii exotických kopytníků v zoologických zahradách.

U lidí zahrnují spongiformní encefalopatie různé formy Creutzfeldtovy-Jakobovy choroby (CJD), kuru, Gerstmannův-Sträusslerův-Scheinkerův syndrom (GSS) a fatální familiární insomnií (FFI).

Byl zaznamenán iatrogenní přenos spongiformních encefalopatií. U ovcí byla náhodně přenesena klusavka při použití vakcíny proti skotské encefalomyelitidě ovcí (louping ill), připravené ze směsných, formaldehydem ošetřených ovčích mozků a slezin, do kterých byl nepozorností zařazen materiál z ovcí infikovaných klusavkou. Došlo rovněž k přenosu klusavky na ovce a kozy při použití inaktivované vakcíny proti infekční agalaktii, připravené ze směsných, formaldehydem ošetřených mozků a mléčných žláz ovcí infikovaných *Mycoplasma agalactiae*. U člověka byly zaznamenány případy přenosu CJD, které byly přičteny na vrub parenterálnímu podání růstového hormonu a gonadotropinu získaných

z kadaverózních hypofýz. Případy CJD byly také přičteny na vrub použití kontaminovaných nástrojů při operaci mozku a transplantaci pleny mozkové (*dura mater*) a rohovky člověka.

Mezidruhový přenos TSE je omezen řadou přirozených bariér, schopnost přenosu může ovlivnit druh původu, kmen prionu, dávka, způsob expozice a u některých druhů hostitelská alela genu PRNP. Za určitých podmínek mohou být druhové bariéry překonány.

Bovinní spongiformní encefalopatie (BSE) byla poprvé zjištěna ve Velké Británii v roce 1986 a postihla značné množství skotu jednotlivě i jednotlivých stád. Je zřejmé, že BSE je choroba související s krmivem (např. masová a kostní moučka) pocházejícím ze zvířat postižených TSE. V dalších zemích se případy BSE vyskytly buď u zvířat dovezených z Velké Británie, nebo u vlastních zvířat. Existuje přesvědčivý důkaz toho, že variantní forma CJD (vCJD) je způsobena agens, které je zodpovědné za BSE u skotu. Proto je třeba pokračovat v oprávněně obezřetném přístupu v případě, že pro výrobu léčivých přípravků se použijí biologické materiály ze živočišných druhů přirozeně postihovaných TSE chorobami, zejména bovinní druhy.

V rámci programů aktivního dozoru byly v Evropě, Severní Americe a Japonsku odhaleny ojedinělé případy dvou dosud nerozpoznaných forem atypické BSE (BSE-L, rovněž nazývaná BASE a BSE-H). Písmena „L“ a „H“ označují vyšší (H) a nižší (L) elektroforetickou pozici jejich izoform PrP^{TSE} rezistentních k protease. Za zmínku stojí, že atypické případy byly zjištěny v zemích, kde se dosud klasická BSE nevyskytovala, jako je Švédsko, nebo ve kterých se vyskytlo jen několik případů klasické BSE, jako je Kanada nebo USA. Agens atypické BSE bylo pokusně přeneseno na transgenní myši exprimující lidskou bílkovinu prionu a na makaka jávského.

Klusavka se vyskytuje celosvětově a byla zaznamenána ve většině evropských zemí, nejvyšší výskyt je na Kypru. Ačkoliv byli lidé vystaveni přirozeně se vyskytující klusavce více než 250 let, neexistuje žádný epidemiologický důkaz, který by přímo spojoval klusavku se spongiformními encefalopatiemi u lidí¹. Zůstává však teoretické a v současné době nekvantifikovatelné riziko, že by nějaký bílkovinný doplněk kontaminovaný BSE mohl být podán jako krmivo ovčím. Dále je možné se domnívat, že jakékoli agens BSE zavlečené do

¹ V současné době je předmětem posuzování ze strany EFSA a ECDC. Aktuální informace jsou dostupné na těchto internetových stránkách:

<http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsListLoader?mandate=M-2009-0221>

populace malých přežvýkavců kontaminovaným krmivem se pravděpodobně recykluje a dále se rozšíří².

Existuje zájem na infikování buněk agens TSE, aby bylo možné vyvinout testy, a pro základní vědecké účely. Již byly ohlášeny určité úspěchy, obvykle (ale ne vždy) s liniemi nervových buněk. Podmínky nutné pro infikování buňky nejsou zcela jasné a celý proces je obtížný, jelikož vyžaduje zvláštní kombinace agens a buňky. Nepovažuje se za vhodné vydávat konkrétní doporučení, pokud jde o buněčné substráty, které se mají používat k výrobě biologických/biotechnologicky získaných látek. Ovšem k možnosti infekce buněčných linií agens TSE by mělo být přihlédnuto v posouzení rizik.

1-2 DODRŽOVÁNÍ PRÁVNÍCH PŘEDPISŮ

Posouzení rizika. Protože použití materiálů získaných ze zvířat je pro výrobu některých léčivých přípravků nevyhnutelné a úplné vyloučení rizika u zdroje je zřídka možné, představují opatření přijatá pro zvládnutí rizika přenosu zvířecích TSE prostřednictvím léčivých přípravků spíše snížení rizika než jeho vyloučení. Výsledně musí být základ pro shodu předpisů založen na posouzení rizika a musí brát v úvahu všechny příslušné okolnosti uvedené v této stati (viz dále).

Právní základ. Tento pokyn zveřejňuje Evropská Komise podle:

- přílohy I, části I, modulu 3, odstavce 3.2: *Obsah: základní zásady a požadavky*, bodu 9 směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2001/83/ES ze dne 6. listopadu 2001 o kodexu Společenství týkajícím se humánních léčivých přípravků³ ve znění pozdějších předpisů, a
- přílohy I, hlavy I, části 2, oddílu C *Výroba a kontrola výchozích surovin* směrnice Evropského parlamentu a Rady č. 2001/82/ES ze dne 6. listopadu 2001 o kodexu Společenství týkajícím se veterinárních léčivých přípravků⁴ ve znění pozdějších předpisů.

Tyto směrnice vyžadují, aby žadatelé o registraci humánních a veterinárních léčivých přípravků prokázali, že léčivé přípravky jsou vyrobeny v souladu s posledním zněním tohoto pokynu, zveřejněného v *Official Journal of the European Union*. Tato povinnost zůstává v platnosti i po udělení registrace.

² V lednu 2005 potom, co byla potvrzena BSE u koz v Francii, byla přijata dodatečná legislativní opatření pro sledování a intenzivnější testování malých přežvýkavců. Zvýšený dozor neodhalil u ovcí a koz v EU žádné další případy BSE.

³ Official Journal of the European Communities L 311, 28. 11. 2001, str. 67.

⁴ Official Journal of the European Communities L 311, 28. 11. 2001, str. 1.

Princip specifikovaných rizikových materiálů, jak je definován v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 999/2001⁵, se podle definice nepoužívá pro léčivé přípravky. Avšak nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002⁶, platné od 1. května 2003, stanoví hygienická pravidla pro vedlejší produkty živočišného původu, které nejsou určeny k lidské spotřebě. Obecným pravidlem je, že všechny vedlejší produkty živočišného původu používané jako výchozí materiály při výrobě léčivých přípravků by měly být „materiály kategorie 3 (tj. bezpečné) nebo rovnocenné“, jak jsou definovány v nařízení (ES) č. 1774/2002, pokud nebylo řádně zdůvodněno použití jiných materiálů. Zdůvodnění pro použití látek získaných z jiných, vysoce infekčních materiálů musí vyplývat z přiměřeného vyhodnocení přínos/riziko (viz dále).

Tyto pokyny se musí chápat ve spojení s různými právními dokumenty EU, včetně rozhodnutí Komise postupně uplatňovaných od roku 1991. Kde je to vhodné, jsou odkazy na tato rozhodnutí uvedeny v textu. Stanoviska a vysvětlující zprávy vydané Výborem pro humánní léčivé přípravky (Committee for Medicinal Products for Human Use – CPMP) a Výborem pro veterinární léčivé přípravky (Committee for Medicinal Products for Veterinary Use – CVMP) se stále používají pro účely dodržování právních předpisů, není-li v tomto pokynu stanoveno jinak.

Obecný článek *Producta cum possibili transmissione vectorium encephalopathiarum spongiformium animalium* je uveden v Evropském lékopisu a odkazuje na obecnou kapitolu Evropského lékopisu, která je totožná s tímto pokynem. Článek vytváří základnu pro vydávání certifikátů shody, jako postup pro prokázání TSE shody pro látky a materiály použité pro výrobu humánních a veterinárních léčivých přípravků.

Objasnění pokynu. Jak se vyvíjejí vědecké poznatky o TSE, zejména o patogenezi onemocnění, mohou být CHMP a jeho pracovní skupina pro biologii (Biologics Working Party) ve spolupráci s CVMP a jeho imunologickou pracovní skupinou (Immunological Working Party) v budoucnosti požádány, aby vypracovaly dodatek pokynu formou stanovisek nebo vysvětlujících zpráv za účelem objasnění tohoto pokynu. Dodatek pokynu bude zveřejněn Komisí a na webových stránkách Evropské lékové agentury (European Medicines Agency – EMA) a brán v úvahu při udělování certifikátů shody Evropským direktorátem pro jakost léčiv (European Directorate for the Quality of Medicines – EDQM).

⁵ Official Journal of the European Communities L 147, 31. 5. 2001, str. 1.

⁶ Official Journal of the European Communities L 273, 10. 10. 2002, str. 1 Nařízení (ES) č. 1069/2009, platné od 4. března 2011 (Official Journal of the European Communities L 300, 14. 11. 2009, str. 1)

2 ROZSAH OBECNÉ STATI

TSE – RELEVANTNÍ ŽIVOČIŠNÉ DRUHY

Skot, ovce, kozy a zvířata, která jsou přirozeně vnímavá k infekci způsobené agens přenosné spongiformní encefalopatie nebo vnímavá k infekci perorální cestou, kromě lidí⁷ a dalších primátů, jsou definovány jako „TSE-relevantní živočišné druhy“⁸.

MATERIÁLY

Tato obecná stať se týká materiálů získaných z „TSE-relevantních živočišných druhů“, použitých pro výrobu:

- léčivých látek;
- pomocných látek a adjuvancií;
- surovin a výchozích materiálů a zkoumadel použitých ve výrobě (např. bovinní sérový albumin, enzymy, kultivační média, včetně těch, která se použijí k přípravě bank pracovních buněk nebo nových bank základních buněk pro léčivé přípravky podléhající nové registraci).

Tato obecná stať se také použije u materiálů, které přicházejí do přímého styku se zařízením použitým při výrobě léčivého přípravku nebo do přímého styku s léčivým přípravkem a mohou tedy být zdrojem kontaminace.

Materiály použité ke kvalifikaci provozu a zařízení, jako jsou kultivační média použitá při experimentu k validaci aseptického postupu plnění, musí rovněž být v souladu s touto obecnou statí za předpokladu, že složka nebo složky pocházejí ze tkání bez zjistitelné infekčnosti (kategorie C tkání), kde bylo vzato v úvahu riziko křížové kontaminace potenciálně infekčními tkáněmi (viz část 3-3) a kde se materiály získaly ze zemí se zanedbatelným nebo kontrolovatelným rizikem výskytu BSE (kategorie A a B – viz část 3-2). Tyto informace se musí uvést v registrační dokumentaci a běžnou inspekci se musí ověřit, že je v souladu se správnou výrobní praxí (SVP).

Ostatní materiály, jako jsou čisticí prostředky, změkčovadla a maziva, které přicházejí do styku s léčivým přípravkem při běžné výrobě, ve finálním stadiu nebo při primárním balení,

⁷ Řídící pokyny a stanoviska byla vydána Výborem pro humánní léčivé přípravky (Committee for Medicinal Products for Human Use) a jeho biologickou pracovní skupinou pro léčivé přípravky získané z lidských tkání ve vztahu k CJD a vCJD. Tento pokyn lze nalézt na <http://www.ema.europa.eu>

⁸ Prasata a ptáci, kteří jsou živočišnými druhy, o které je mimořádný zájem pro výrobu léčivých přípravků, nejsou přirozeně vnímaví k infekci perorální cestou. Nejsou to tedy TSE-relevantní živočišné druhy ve smyslu tohoto pokynu. Také psi, králíci a ryby nejsou TSE-relevantní živočišné druhy ve smyslu tohoto pokynu.

se považují za vyhovující této obecné stati, jestliže se získaly z derivátů loje za použití přesných fyzikálně-chemických postupů popsaných v části 6.

JEDNOTNÁ INOKULA, BUNĚČNÉ BANKY A BĚŽNÁ FERMENTACE/VÝROBA⁹

Pro dosažení právní shody, musí být matečná inokula nebo banky základních buněk v žádostech o registraci podaných po 1. červenci 2000 (pro humánní léčivé přípravky) nebo po 1. říjnu 2000 (pro veterinární léčivé přípravky) v souladu s tímto pokynem.

Matečná inokula a banky základních buněk pro:

- vakcinační antigeny,
- biotechnologicky vyrobený léčivý přípravek popsaný v příloze nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 726/2004¹⁰,
- ostatní léčivé přípravky, při jejichž výrobě se používají systémy jednotné inokulace nebo systémy buněčných bank,

kteří již byly schváleny pro výrobu některé složky registrovaného léčivého přípravku, se považují za vyhovující tomuto pokynu, i když jsou uvedeny v žádostech o registraci podaných po 1. červenci 2000 (pro humánní léčivé přípravky) nebo 1. říjnu 2000 (pro veterinární léčivé přípravky).

U bank základních buněk a matečných inokul zřízených před 1. červencem 2000 (pro humánní léčivé přípravky) nebo před 1. říjnem 2000 (pro veterinární léčivé přípravky), ale ještě neschválených jako složka nějakého registrovaného léčivého přípravku, se musí prokázat splnění požadavků tohoto pokynu. Jestliže pro některou surovinu, výchozí materiál nebo zkoumadlo použité pro založení těchto buněčných bank nebo inokul není nebo nyní již není k dispozici úplná dokumentace, má žadatel předložit odhad rizika, jak je popsáno v části 4 tohoto pokynu.

Založená pracovní inokula nebo buněčné banky použité ve výrobě léčivých přípravků registrovaných před 1. červencem 2000 (humánní léčiva) nebo 1. říjnem 2000 (veterinární léčiva), podrobené vlastnímu odhadu rizika oprávněnou autoritou členských států nebo EMA a prohlášené za přijatelné, se považují za vyhovující.

⁹ Viz také: Písemné stanovisko odhadu rizika přenosu původců zviřecí spongiformní encefalopatie matečnými inokuly použitými ve výrobě veterinárních vakcín (EMEA/CVMP/019/01 – únor 2001) přijaté **Výborem pro veterinární léčivé přípravky** (CVMP) v červenci 2001, Official Journal of the European Communities C 286, 12. 10. 2001, str. 12.

¹⁰ Official Journal of the European Communities L 136, 30. 4. 2004, str. 1.

Kde však jsou suroviny získané z „TSE-relevantních živočišných druhů“ použité v postupech fermentace/běžné výroby nebo k založení pracovních inokul a bank pracovních buněk, musí žadatel prokázat, že vyhovují požadavkům tohoto pokynu.

3 OBECNÉ ÚVAHY

3-1 VĚDECKÉ ZÁSADY PRO MINIMALIZACI RIZIKA

Mají-li výrobci na výběr, dává se přednost použití surovin z „ne TSE-relevantních živočišných druhů“ nebo surovin neživočišného původu. Je třeba zdůvodnit použití surovin získaných z „TSE-relevantních živočišných druhů“ místo surovin z „ne TSE-relevantních živočišných druhů“ nebo surovin neživočišného původu. Jestliže se musí použít suroviny z „TSE-relevantních živočišných druhů“, je třeba zvážit všechna nutná opatření k minimalizaci rizika přenosu TSE.

Snadno použitelné diagnostické *in vivo* zkoušky infekčnosti TSE nejsou ještě k dispozici. Diagnóza je založena na postmortálním histopatologickém potvrzení charakteristických mozkových lézí a/nebo na detekci PrP^{TSE} pomocí Western blotu nebo imunoanalýzou. Pro potvrzení se také používá průkaz infekčnosti inokulací suspektní tkáně cílovému druhu zvířat nebo laboratorním zvířatům. Avšak vzhledem k dlouhým inkubačním dobám všech TSE jsou výsledky zkoušek *in vivo* k dispozici až po měsících nebo po letech.

Bylo vyvinuto několik imunochemických zkoušek pro detekci PrP^{TSE} ve vzorcích *post mortem* a některé z nich se nyní považují za vysoce citlivé. Jejich schopnost odhalit infikované zvíře však závisí na době odběru vzorků v souvislosti s dobou expozice, na typu odebrané tkáně a dosažené dávce infekce, stejně jako na následné době propuknutí klinického stadia onemocnění. V současnosti není k dispozici dostatek informací o tom, jaký vliv by mohly mít varianty kmene.

I když výběr zvířat sloužících jako zdroj pomocí screeningových *in vitro* zkoušek může zabránit použití zvířat v pokročilých stádiích inkubace onemocnění a může poskytnout informaci o epidemiologické situaci dané země nebo regionu, žádná z těchto zkoušek se nepovažuje za vhodnou pro jednoznačné potvrzení negativního stavu zvířete.

Minimalizace rizik přenosu TSE je založena na třech doplňujících se ukazatelích, jimiž jsou:

- zvířata sloužící jako zdroj a jejich geografický původ;
- povaha živočišného materiálu použitého ve výrobě a všechny dostupné postupy k zamezení křížové kontaminaci s materiály s vyšším rizikem;
- výrobní postup (postupy) včetně funkčního systému jištění jakosti pro zajištění jednotnosti přípravku a dohledatelnosti.

3-2 ZVÍŘATA JAKO ZDROJ

Zdroje materiálů použitých pro výrobu látek pro léčivé přípravky se získávají ze zvířat vhodných pro lidskou spotřebu po před- a posmrtné prohlídce, v souladu s podmínkami EU nebo rovnocennými podmínkami (třetí země), s výjimkou materiálů získaných ze živých zvířat, která musí být klinickým vyšetřením shledána zdravými.

3-2-1 Geografický původ zdroje

3-2-1-1 Bovinní materiály

Světová organizace pro zdraví zvířat (Organisation Internationale des Epizooties – OIE¹¹) stanoví kritéria pro hodnocení statutu zemí v kapitole Bovinní spongiformní encefalopatie Kodexu zdraví suchozemských živočichů. Země nebo oblasti se klasifikují takto:

- A. země nebo oblasti se zanedbatelným rizikem výskytu BSE;
- B. země nebo oblasti s kontrolovaným rizikem výskytu BSE;
- C. země nebo oblasti s neurčeným rizikem výskytu BSE.

Jak je stanoveno v nařízení Komise (ES) č. 999/2001, ve znění pozdějších předpisů¹², je klasifikace zemí nebo jejich oblastí podle rizika výskytu BSE na základě pravidel stanovených OIE v EU právně závazná od 1. července 2007. Rozhodnutí Komise 2007/453/ES, ve znění pozdějších předpisů¹³, stanoví klasifikaci zemí nebo oblastí podle geografického rizika BSE.

Vědecký řídicí výbor Evropské komise (SSC)¹⁴, původně zavedl dočasný systém klasifikace zemí podle geografického rizika BSE (GBR)¹⁵.

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

¹² Nařízení (ES) č. 722/2007 (Official Journal of the European Communities L 164, 26. 6. 2007, str. 7)

¹³ Official Journal of the European Communities L 172, 30. 6. 2007, str. 84.

¹⁴ Vědecký řídicí výbor ustavený rozhodnutím Komise 97/404/ES (Official Journal of the European Communities L 169, 27. 6. 2007, str. 85) má pomáhat Komisi získat nejlepší dostupné vědecké poradenství v záležitostech souvisejících se zdravím spotřebitele. Od května 2003 převzal jeho úlohu Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA): <http://www.efsa.europa.eu>

¹⁵ Klasifikace podle geografického rizika BSE (GBR), kterou vytvořil evropský Vědecký řídicí výbor, udává úroveň pravděpodobnosti výskytu jednoho nebo více kusů skotu klinicky nebo preklinicky infikovaného BSE v dané zemi nebo regionu. Definice čtyř kategorií je uvedena v tabulce:

Úroveň rizika (GBR)	Přítomnost jednoho nebo více kusů skotu klinicky nebo preklinicky infikovaného BSE v geografickém regionu/zemi
I	vysoce nepravděpodobná
II	nepravděpodobná, ale nedá se vyloučit

Pro účely těchto pokynů by se měla používat klasifikace BSE založená na pravidlech OIE. Pokud země, která byla původně klasifikována podle kritérií GBR vytvořených SSC a ještě není klasifikována podle pravidel OIE, lze používat klasifikaci GBR do té doby, než proběhne klasifikace OIE, pokud neexistují žádné doklady o závažných změnách týkajících se rizika výskytu BSE v dotčené zemi¹⁶.

Pokud existuje možnost volby, měla by se zvířata získávat ze zemí s co nejnižším možným rizikem výskytu BSE (země se zanedbatelným rizikem výskytu BSE (kategorie A)), pokud není odůvodněno použití materiálu ze zemí s vyšším rizikem výskytu BSE. Některé materiály uvedené v oddílu 6 „Zvláštní podmínky“ mohou být získávány ze zemí s kontrolovaným rizikem výskytu BSE (kategorie B) a, v některých případech, ze zemí s neurčeným rizikem výskytu BSE (kategorie C) za předpokladu, že se použijí kontroly a požadavky dále specifikované v příslušných oddílech. Kromě uvedených výjimek nesmí být získávána zvířata ze zemí s neurčeným rizikem výskytu BSE (kategorie C) a pro používání zvířat ze zemí s neurčeným rizikem výskytu BSE (kategorie C) musí být vždy podáno odůvodnění.

3-2-1-2 Ovice a kozy (malí přežvýkavci)

Přirozeně se vyskytující případy klinické klusavky byly ohlášeny v řadě zemí po celém světě. Protože BSE u ovcí a koz se může zaměnit za klusavku, při odebrání surovin získaných z malých přežvýkavců se jako preventivní opatření bere v úvahu prevalence výskytu jak BSE, tak klusavky v dané zemi, i ve tkáních, ze kterých jsou suroviny získány.

V souvislosti s malými přežvýkavci se mohou použít stejné zásady jako u „Stád skotu (uzavřených) se zanedbatelným rizikem BSE“ (viz část 3-2-2), aby se definoval TSE statut stáda malých přežvýkavců. U ovcí, u kterých je obava z možnosti výskytu BSE ovcí, je třeba uvážit při vytváření stád prostých TSE použití genotypu (genotypů) prokazatelně rezistentních k infekci BSE/klusavka¹⁷. Avšak je třeba rovněž přihlídnout k možnosti, že genotypy odolné vůči klusavce by mohly být vnímavé vůči BSE (pokusná perorální expozice) nebo netypické

III	pravděpodobná, ale nepotvrzená nebo potvrzená v menší míře
IV	potvrzená ve větší míře (≥ 100 případů/1 milion kusů dospělého skotu za rok)

Zprávy o hodnocení úrovně geografického rizika BSE (GBR) zemí jsou k dispozici na internetové stránce SSC (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html).

¹⁶ Odborníci se domnívají, že systém klasifikace GBR je dostatečně stabilní, aby mohl být v přechodném období nadále používán k prokázání shody s těmito pokyny.

¹⁷ Stanovisko vědecké komise pro biologická nebezpečí týkající se šlechtitelského programu zaměřeného na odolnost vůči TSE u ovcí: http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620775678.htm

klusavce (přirozené případy). Kozy nebyly dostatečně studovány s ohledem na vnímavost ke specifickému genotypu.

Suroviny pocházející z malých přežvýkavců by se měly přednostně získávat ze zemí, kde se dlouho nevyskytla klusavka. Pokud je surovina získávána z jiných zdrojů, požaduje se zdůvodnění.

3-2-2 Stáda skotu (uzavřená) se zanedbatelným rizikem BSE

Nejbezpečnější je získávání zdrojů ze zemí nebo oblastí se zanedbatelným rizikem výskytu BSE (země kategorie A). V ostatních zemích se může nebo mohla by se BSE v určité době vyskytnout a praktické pojetí „stád skotu (uzavřených) se zanedbatelným rizikem BSE“ bylo definováno SSC a podpořeno CPMP a CVMP. Kritéria pro založení a udržení „stáda skotu (uzavřeného) se zanedbatelným rizikem BSE“ jsou uvedena v materiálu SSC z 22. až 23. července 1999¹⁸.

V současné době není možné kvantifikovat snížení úrovně geografického rizika BSE pro skot ze stád skotu (uzavřených) se zanedbatelným rizikem BSE. Očekává se však, že toto snížení rizika je značné. Proto je získávání zdrojů z těchto uzavřených stád skotu třeba při odhadu rizika zohlednit v souvislosti s klasifikací rizika OIE dané země.

3-3 ČÁSTI ZVÍŘAT, TĚLNÍ TEKUTINY A SEKRETY JAKO VÝCHOZÍ MATERIÁLY

Různé orgány a sekrety zvířete infikovaného TSE mají různou míru infekčnosti. Pokud se musí použít materiály z „TSE-relevantních živočišných druhů“, mělo by se zvážit použití materiálů z nejnižší kategorie rizika. Tabulky v příloze této stati¹⁹ shrnují současné údaje o rozdělení infekčnosti a PrP^{TSE} u skotu s BSE a u ovcí a koz s klusavkou²⁰.

Informace uvedené v tabulkách jsou založeny pouze na pozorováních přirozeně se vyskytujícího onemocnění nebo na primární experimentální infekci perorální cestou (u skotu), ale nezahrnují údaje o modelech používajících kmene TSE, které byly přizpůsobeny pokusným zvířatům, protože fenotypy pasážovaného kmene se mohou významně a nepředvídatelně lišit od fenotypů přirozeně se vyskytujícího onemocnění. Protože detekce

¹⁸ Vědecké stanovisko SSC k podmínkám týkajícím se „bovinních stád (uzavřených) s nepatrným rizikem BSE“ přijaté na zasedání z 22. až 23. července 1999, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out56_en.html

¹⁹ Tabulky klasifikace tkání jsou založeny na nejnovějších pokynech WHO o distribuci infekčnosti tkání u přenosných spongiformních encefalopatií (2010), <http://www.who.int/bloodproducts/tablestissueinfectivity.pdf>

²⁰ Vědecké stanovisko týkající se infekčnosti BSE/TSE u tkání malých přežvýkavců je v současné době znovu zkoumáno ze strany EFSA (otázka č. EFSA-Q-2010-052). Aktuální informace lze nalézt na těchto internetových stránkách: <http://registerofquestions.efsa.europa.eu/roqFrontend/questionsListLoader?mandate=M-2010-0041>

abnormální hostitelské bílkoviny (PrP^{TSE}), imunohistochemicky a/nebo pomocí Western blotu, prokázaly, že mohou být náhradním ukazatelem infekčnosti, byly výsledky testování PrP^{TSE} uvedeny současně s údaji biologického pokusu. Tkáně jsou seřazeny do tří hlavních kategorií infekčnosti bez ohledu na stadium onemocnění:

kategorie IA	vysoce infekční tkáně: tkáně centrálního nervového systému (CNS), které dosahují vysokého titru infekčnosti v pozdějších stadiích u všech TSE, a určité tkáně, které anatomicky souvisí s CNS
kategorie IB	méně infekční tkáně: periferní tkáně, které byly vyšetřeny pozitivně na infekčnost a/nebo PrP ^{TSE} nejméně u jedné formy TSE
kategorie IC	tkáně s nezjistitelnou infekčností: tkáně, které byly vyšetřeny na infekčnost, aniž byla jakákoli infekčnost zjištěna a/nebo na PrP ^{TSE} s negativními výsledky

Tkáně kategorie IA a látky z nich získané se nesmí použít pro výrobu léčivých přípravků, pokud to není zdůvodněno (viz část 5).

I když kategorie méně infekčních tkání (kategorie IB) téměř určitě zahrnuje některou tkáň (např. krev) s nižším rizikem než ostatní (např. lymforetikulární tkáně), údaje o stupni infekčnosti těchto tkání jsou příliš omezené, aby bylo možné kategorii dále rozdělit do různých úrovní rizika. Je také zřejmé, že zařazení dané tkáně do jedné nebo druhé kategorie může být specifické pro onemocnění a živočišný druh a že zařazování se bude upravovat podle nově získaných údajů.

Pro posouzení rizika (viz část 4) výrobci a/nebo držitelé/žadatelé o registraci vezmou v úvahu tabulky klasifikace tkání v příloze k této stati.

Kategorie v tabulkách jsou pouze oznamovací a je důležité uvést následující skutečnosti.

– V určitých situacích může dojít ke **křížové kontaminaci** tkání různých kategorií infekčnosti. Okolnosti, za kterých byly tkáně odebrány, zejména styk méně infekčních tkání nebo tkání s nezjistitelnou infekčností (kategorie IB a IC) s tkáněmi vysoce infekčními (kategorie IA), mohou mít vliv na potenciální riziko. Proto, jestliže se infikovaná zvířata porážejí pomocí mozem pronikající omračující pistole (penetrační nebo nepenetrační), nebo jestliže mozek a/nebo mícha se neodstraní, může být křížová kontaminace u některých tkání zvýšena. Riziko křížové kontaminace se sníží, jestliže se tělní tekutiny odeberou s minimálním poškozením tkáně a buněčné složky se odstraní a jestliže fetální krev se

odebere bez kontaminace jinými mateřskými nebo fetálními tkáněmi, včetně placenty a amniové a alantoidní tekutiny. U některých tkání je velmi nesnadné nebo nemožné zabránit křížové kontaminaci tkáněmi kategorie IA (např. lebka). To se musí vzít při posouzení rizika v úvahu.

– Pro určité skupiny surovin mohou mít při určování možného rizika²¹ význam použité **techniky omračování/porážení**, vzhledem k pravděpodobnosti rozvlečení částeczek mozku do periferních orgánů, zejména do plic. Omračovací/porážecí techniky by měly být popsány, stejně jako postupy k odstraňování vysoce infekčních tkání. Postupy odběru živočišných tkání/orgánů, které se mají použít, a opatření k zabránění křížové kontaminaci s více rizikovým materiálem při prováděných postupech se také musí podrobně popsat.

– Riziko kontaminace tkání a orgánů BSE infekcí potenciálně přechovávanou v centrálním nervovém materiálu jako následek omračovací metody použité při porážení skotu závisí na následujících faktorech:

- množství BSE infekčnosti v mozku poraženého zvířete;
- rozsahu poškození mozku;
- rozvlečení mozkových částic v těle zvířete.

Tyto faktory se musí brát v úvahu ve spojení s klasifikací geografického rizika (OIE/GBR) u zvířat použitých jako zdroj, se stářím zvířat v případě skotu a s postmortálním zkoušením skotu validovanou metodou.

Výše uvedené zásady se mohou stejně použít pro ovce a kozy.

Riziko způsobené křížovou kontaminací závisí na několika doplňujících faktorech, které zahrnují:

- opatření přijatá k zabránění kontaminace během odběru tkání (viz výše);
- úroveň kontaminace (množství kontaminující tkáně);
- množství a typ surovin odebraných ve stejnou dobu.

Výrobci nebo držitelé/žadatelé o registraci by měli brát v úvahu riziko s ohledem na křížovou kontaminaci.

3-4 STÁŘÍ ZVÍŘAT

²¹ Stanovisko SSC na omračovací metody a riziko BSE (Riziko rozšíření mozkových částeczek do krve a jatečně upravených těl (kadáverů) při použití určitých omračovacích metod) přijaté na shromáždění 10. až 11. ledna 2002, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out245_en.pdf. Zpráva pracovní skupiny EFSA o riziku BSE v souvislosti s rozšířením mozkových částeczek do krve a jatečně upraveného těla. Otázka č. EFSA-Q-2003-122 přijatá dne 21. října 2004, http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178620777397.htm

Infekčnost TSE u skotu vzrůstá v průběhu několikaleté inkubační doby, proto je vhodnější používat jako zdroje mladá zvířata.

Přítomnost infekčního materiálu byla v zásadě zaznamenána v CNS a souvisejících tkáních a rovněž v lymforetikulárním systému v závislosti na TSE agens (BSE u skotu nebo klusavka u ovcí a koz). Přesný časový průběh infekčnosti v příslušných částech těla a tkáních od data infekce není u žádného z těchto dvou druhů znám, a proto je obtížné poskytnout jasné pokyny ohledně věku, od kterého mohou být tyto různé tkáně infikovány a neměly by se odebírat. Stále platí původní doporučení, a sice odebírat tkáně v co nejnižším věku. Kromě toho je třeba zmínit, že kritéria věku závisí také na geografickém původu. Věk je důležitějším parametrem u materiálů ze zemí s vyšším rizikem (země kategorie B a C) než u materiálů ze zemí se zanedbatelným rizikem výskytu BSE (země kategorie A).

3-5 VÝROBNÍ POSTUP

Při hodnocení celkového snížení TSE rizika léčivého přípravku se vezmou v úvahu kontrolní opatření zavedená s ohledem na:

- zdroje suroviny/výchozích materiálů;
- výrobní postup.

Kontrolované zdroje jsou velmi významným kritériem v dosažení přijatelné bezpečnosti výrobku vzhledem k doložené odolnosti agens TSE k většině inaktivačních postupů.

Systém jištění jakosti, jako je certifikace ISO 9000, HACCP²² nebo SVP, se musí zavést pro sledování výrobního postupu a pro podrobné zmapování šarže (tj. definování šarže, oddělení šarží, čištění mezi šaržemi). Zavedou se postupy k zajištění dohledatelnosti, interní audit a audit dodavatelů surovin/výchozích materiálů.

Určité výrobní postupy mohou výrazně přispět ke snížení rizika kontaminace TSE, např. postupy použité ve výrobě derivátů loje (viz část 6). Protože se tyto přísné postupy nemohou u řady výrobků použít, zdá se být k odstranění materiálu bohatého na priony vhodnější použití fyzikálních metod, jako je srážení a filtrace, než použití metod chemických. Uvede se popis výrobního postupu, včetně použitých mezioperačních kontrol, a měly by se diskutovat kroky, které mohou přispět ke snížení nebo k vyloučení kontaminace TSE. Když se na výrobě podílejí různá výrobní místa, identifikují se jasně kroky provedené na každém místě. Měla by být popsána opatření k zajištění dohledatelnosti každé výrobní šarže ke zdroji suroviny.

Čisticí postup. Postup čištění výrobního zařízení se může z hlediska odstranění agens TSE nesnadno validovat. Je známo, že zjištělná infekčnost může zůstat navázána na povrch

²² Hazard Analysis Critical Control Point (kritické kontrolní body analýzy rizika)

nerezavějící oceli po vystavení přípravkům s vysokým titrem TSE agens. Odstranění veškeré adsorbované bílkoviny za použití hydroxidu sodného (1 mol/l) nebo dezinfekčních přípravků uvolňujících chlor (např. 2 % chloru po dobu 1 hodiny) bylo shledáno přijatelné tam, kde zařízení, které se nemůže vyměnit, bylo vystaveno potenciálně kontaminovanému materiálu. Bylo prokázáno, že mírnější ošetření omezenými koncentracemi zásaditých látek nebo stabilizovaným alkalickým postupem provedené při správném použití detergentů a při specifických teplotách má na odstraňování prionů podobný účinek jako klasické ošetření hydroxidem sodným nebo chlorem. Ukázalo se, že při inaktivaci TSE agens je účinný i systém založený na odpařování peroxidu vodíku. Tyto nové druhy ošetření lépe vyhovují choulostivým materiálům a mohou být vhodné pro praktické použití²³.

Jestliže se při výrobě přípravku použije rizikový materiál, provádějí se čisticí postupy včetně kontrolních opatření tak, aby se minimalizovalo riziko křížové kontaminace mezi výrobními šaržemi. To je obzvláště důležité, jestliže se ve stejné provozovně a na stejném zařízení zpracovávají materiály s různými kategoriemi rizika. Pokud se použije materiál kategorie IA, musí se při výrobě přípravku použít určené vybavení, není-li zdůvodněno jinak.

Je třeba dalšího výzkumu, aby bylo možné vyvinout a validovat nové postupy dekontaminace pro snížení rizika křížové kontaminace u materiálů a zařízení, které nejsou v souladu s doporučenými postupy WHO.

Validace odstranění/inaktivace. Validací studie postupů na odstranění/inaktivaci TSE mohou být nesnadno interpretovatelné. Je nezbytné vzít v úvahu charakter materiálu po přidání zátěže ve vztahu k přirozené situaci, plán studie (včetně poměru zmenšení výrobního postupu) a metodu detekce agens (stanovení *in vitro* nebo *in vivo*). Pro vývoj a pochopení nejvhodnějších metodik validačních studií je nezbytný další výzkum. Z tohoto důvodu nejsou validační studie v současné době obecně požadovány. Ovšem v případě, že budou vneseny požadavky na bezpečnost přípravku ve vztahu k TSE na základě schopnosti výrobního postupu odstranit/inaktivovat TSE agens, musí se doložit vhodné validační studie²⁴.

Výrobci jsou vedle získávání vhodných zdrojů vyzýváni k pokračování ve svých výzkumech metod odstraňování a inaktivace, aby se určily kroky/postupy, které by mohly přispět k bezpečnému odstranění nebo inaktivaci agens TSE.

²³ Pokyny WHO o distribuci infekčnosti tkání u přenosných spongiformních encefalopatií (2006),

<http://www.who.int/bloodproducts/tse/WHO%20TSE%20Guidelines%20FINAL-22%20JuneupdatedNL.pdf>

²⁴ Pokyny týkající se hodnocení výrobního postupu léčivých přípravků získaných z plazmy ve vztahu k riziku vCjD, CPMP/BWP/5136/03.

U některých typů produktů (viz část 6-3 Bovinní krev a krevní deriváty), u nichž není snadné použít validované odstranění/inaktivace, se může požadovat hodnocení výrobního postupu. Toto hodnocení by mělo být založeno na výchozím materiálu a veškerých zveřejněných údajích o riziku TSE.

4 POSOUZENÍ RIZIK U MATERIÁLŮ NEBO LÁTEK POUŽITÝCH PŘI VÝROBĚ A PŘÍPRAVĚ LÉČIVÉHO PŘÍPRAVKU V SOUVISLOSTI S DODRŽOVÁNÍM PRÁVNÍCH PŘEDPISŮ

Odhad rizika spojeného s TSE vyžaduje pečlivé zvážení všech ukazatelů, které jsou uvedeny v části 3.1 (Vědecké zásady pro minimalizaci rizika).

Jak je uvedeno v úvodu k této stati, je shoda předpisů založena na příznivém výsledku odhadu rizika. Odhady rizika provedené výrobcí a/nebo držiteli registrace nebo žadateli o registraci pro různé materiály nebo látky z „TSE-relevantních živočišných druhů“ použité při výrobě léčivého přípravku by měly ukázat, že byly vzaty v úvahu všechny rizikové faktory TSE a, kde je to možné, bylo riziko minimalizováno použitím zásad popsaných v této stati. Certifikáty o shodě týkající se TSE, vydané EDQM, mohou držitelé registrace nebo žadatelé použít jako základ odhadů rizika.

Celkový odhad rizika pro léčivý přípravek, provedený držiteli registrace nebo žadateli, vezme v úvahu odhady rizika pro všechny materiály z „TSE-relevantních živočišných druhů“ a, kde je to vhodné, snížení nebo inaktivaci TSE rizika při výrobě léčivé látky a/nebo konečného výrobku.

Konečné vymezení shody předpisů je ponecháno oprávněné autoritě.

Je povinností výrobců a/nebo držitelů registrace nebo žadatelů vybrat a zdůvodnit kontrolní opatření pro daný derivát „TSE-relevantního živočišného druhu“ pro humánní i pro veterinární léčivé přípravky se zřetelem na nejnovější pokroky vědy a technologie.

5 HODNOCENÍ PŘÍNOSU/RIZIKA

Navíc se k ukazatelům uvedeným v části 3, na které se může vztahovat TSE Certifikát shody vydaný EDQM a v části 4 pro přijatelnost jednotlivých léčivých přípravků, které obsahují materiály získané z „TSE-relevantních živočišných druhů“ nebo které mohou takové materiály obsahovat v důsledku výroby, vezmou v úvahu následující skutečnosti:

- způsob podání léčivého přípravku;
- množství živočišného materiálu použitého v léčivém přípravku;
- maximální terapeutická dávka (denní dávka a trvání léčby);

- zamýšlené použití léčivého přípravku a jeho klinický přínos;
- přítomnost druhové bariéry.

Vysoce infekční tkáně (kategorie IA) a látky z nich získané se nesmí používat při výrobě léčivých přípravků, při výrobě jejich výchozích materiálů a meziproductů (včetně léčivých a pomocných látek a zkoumadel), pokud to není zdůvodněno. Mají se předložit odůvodnění, proč se nemohou použít žádné jiné materiály. V těchto výjimečných a zdůvodněných případech se může pro výrobu léčivých látek uvažovat o použití tkání o vysoké infekčnosti, pokud může žadatel o registraci po provedení odhadu rizika, jak je popsáno v části 4 této stati, a se zřetelem k zamýšlenému klinickému použití předložit pozitivní vyhodnocení přínosu/rizika. Látky z materiálů kategorie IA, jestliže je jejich použití zdůvodněno, musí být vyrobeny ze zvířat pocházejících ze zemí se zanedbatelným rizikem výskytu BSE (kategorie A).

6 SPECIFICKÉ ROZVAHY

Následující materiály připravené z „TSE-relevantních živočišných druhů“ se považují za vyhovující této stati, pokud splňují alespoň dále uvedené podmínky. Žadatel/držitel registrace poskytne relevantní informace nebo certifikát shody vydaný EDQM.

6-1 KOLAGEN

Kolagen je vláknitá bílkovinná složka pojivové tkáně savců.

Pro kolagen je třeba poskytnout dokumentaci prokazující shodu s touto statí, která bere v úvahu ustanovení uvedená v částech 3 až 5. Navíc by se mělo brát v úvahu následující:

- Pro kolagen vyrobený z kostí se použijí podmínky určené pro želatinu (viz dále). Při postupu výroby kolagenu se očekává nižší schopnost inaktivace než při postupu výroby želatiny, proto se získávání zdrojů stává mnohem kritičtějším aspektem rozvahy.
- Kolagen vyrobený ze tkání, jako jsou usně a kůže, šlachy a vaziva, obvykle nepředstavuje měřitelné riziko TSE za předpokladu, že se během jejich odběru zabrání kontaminaci potenciálně infikovanými materiály, např. potřísněním krví a/nebo tkáněmi centrálního nervového systému. Kůže proto představují bezpečnější surovinu pro lidské implantáty odvozené od kolagenu. Ovšem zkřížené kontaminaci mozkovou tkání uvolněnou během porážky, která mohla zaschnout na kůži, by bylo mohlo být obtížné zabránit. To představuje další aspekt ke zvážení při hodnocení bezpečnosti tohoto zdrojového materiálu. Postup výroby kolagenu může mít některé kroky společné s postupem výroby želatiny, jako je ošetření alkalickým postupem a síranem sodným, ošetření hydroxidem vápenatým a hydroxidem sodným nebo ošetření enzymy. I tyto společné kroky se však mohou lišit délkou

expozice a hodnotou pH, což může způsobit značné rozdíly v jejich schopnosti inaktivace. Výrobci by měli na podporu bezpečnosti produktu alespoň provést vyhodnocení založené na podobných krocích výrobního postupu při zpracování kolagenu a kroků, jejichž účelem je inaktivace při výrobě želatiny. Kromě způsobů zpracování, existují i rozdíly v konečném použití materiálů, a tedy i v posouzení jeho rizik. Zatímco želatina se používá především perorálně, kolagen se často využívá jako chirurgické implantáty, což je aspekt, který by se měl v konečném posouzení rizika rovněž zvážit.

6-2 ŽELATINA

Želatina je přírodní rozpustná bílkovina, gelující nebo negelující, získaná částečnou hydrolyzou kolagenu z kostí, usní a kůží, šlach a svalů zvířat.

Pro želatinu je třeba poskytnout dokumentaci prokazující shodu s touto statí, která bere v úvahu ustanovení uvedená v částech 3 až 5. Navíc by se měly brát v úvahu následující požadavky²⁵.

Zdroj použité suroviny

Želatina použitá v léčivých přípravcích může být vyrobena z kostí nebo usní.

Usně jako výchozí materiál. Na základě současných znalostí představují usně použité pro výrobu želatiny bezpečnější zdroj než kosti. Důrazně se však doporučuje, aby byla během jejich získávání dodržována opatření zabráňující křížové kontaminaci potenciálně infikovanými materiály.

Kosti jako výchozí materiál. Pokud se želatina vyrábí z kostí, je třeba pro zajištění bezpečnosti konečného produktu kontrolovat jako dodatečný parametr jakost výchozího materiálu. Proto by mělo platit:

1. Z odebíraných kostí (suroviny/výchozí materiál) je třeba odstranit lebky a páteřní míchy, bez ohledu na věk a zemi původu skotu.
2. Ze surovin/výchozího materiálu skotu staršího 30 měsíců ze zemí s kontrolovaným nebo neurčeným rizikem výskytu BSE (kategorie B nebo C) je nutné odstranit obratle.
3. Želatina pro parenterální podání by se měla vyrábět pouze z kostí pocházejících ze zemí se zanedbatelným nebo kontrolovaným rizikem výskytu BSE (kategorie A nebo B). Želatina pro perorální podání se může vyrábět z kostí pocházejících ze zemí

²⁵ Na základě stanoviska vědecké komise pro biologická nebezpečí Evropského úřadu pro bezpečnost potravin s názvem „Kvantitativní posouzení rizik BSE spojených se želatinou u lidí s ohledem na zbytkové riziko BSE“ („Quantitative assessment of the human BSE risk posed by gelatine with respect to residual BSE risk“), *The EFSA Journal*, 312, (1-28). http://www.efsa.europa.eu/EFSA_locale-1178620753812_1178620776107.htm. Požadavky na výběr a zpracování výchozího materiálu jsou vhodné pro perorální a parenterální podání želatiny použité pro humánní a veterinární léčivé přípravky.

se zanedbatelným, kontrolovaným nebo neurčeným rizikem výskytu BSE (kategorie A, B nebo C).

4. Želatina se musí vyrábět jednou z výrobních metod uvedených dále.

Metody zpracování

Kůže. Vzhledem k podmínkám zpracování se nepožadují žádná specifická opatření pro želatinu vyráběnou z usní s podmínkou, že se dodržují kontrolní opatření, aby se zabránilo křížové kontaminaci během získávání nevydělaných kůží i během postupu zpracování.

Kosti. Pokud se použijí jako výchozí materiál kosti, způsob výroby bude druhým parametrem pro zajištění bezpečnosti želatiny.

- Želatinu je možné vyrábět z kostí pocházejících ze zemí se zanedbatelným, kontrolovaným nebo neurčeným rizikem výskytu BSE (kategorie A, B nebo C) získaných v souladu s podmínkami popsány v odstavci 6-2. Zdroj použité suroviny, za použití kyselého, alkalického nebo tepelně-tlakového postupu.
- Výrobní postup se má brát v úvahu při posuzování rizik, jak je popsáno v části 4 této statě. Při použití kyselého nebo alkalického postupu při validačních pokusech u želatiny prokázala podobná celková inaktivace/odstranění infekčnosti TSE. Studie ukázaly, že dodatečné ošetření kostí/oseinu alkalickým postupem (2 h, při hodnotě pH 13) dále zvýší schopnost inaktivace/odstranění TSE u výrobního postupu. K bezpečnosti želatiny přispívají i další kroky zpracování, jako je filtrace, iontoměničová chromatografie a sterilizace UHT.
- Při typickém alkalickém výrobním postupu se kosti rozdrtí najemno, odtuční se horkou vodou a demineralizují se zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (minimálně 4%, při hodnotě pH méně než 1,5) po nejméně dva dny, aby se vyrobil osein. Potom následuje alkalické ošetření nasyceným roztokem hydroxidu vápenatého (hodnota pH nejméně 12,5) po dobu nejméně 20 dnů.
- Hovězí kosti se také mohou ošetřit kyselým postupem. Působení roztoku hydroxidu vápenatého se potom nahradí předběžným ošetřením kyselinou, kterému je osein vystaven po dobu nejméně 10 h při hodnotě pH menší než 3,5.
- Při kyselém a alkalickém výrobním postupu se používá „bleskové“ ošetření teplem (sterilizace), po dobu alespoň 4 s při teplotě nejméně 138 °C.
- Při tepelně-tlakovém postupu se rozdrcené odtučněné usušené kosti sterilizují v autoklávu nasycenou parou po dobu nejméně 20 min při tlaku přesahujícím 300 kPa a teplotě nejméně 133 °C, pak následuje extrakce bílkoviny horkou vodou.

Závěrečné kroky jsou stejné pro kyselý, alkalický nebo tepelně-tlakový výrobní postup, želatina se extrahuje, promyje, filtruje a koncentruje.

6-3 BOVINNÍ KREV A KREVNÍ DERIVÁTY

Fetální bovinní sérum se obvykle používá v buněčných kulturách. Fetální bovinní sérum by se mělo získávat na porážkách z plodů zdravých matek určených pro účely výživy lidí, u nichž se děloha úplně odstraní a fetální krev se odebírá na ploše nebo v prostoru vymezeném pro tento účel punkcí srdce do uzavřeného odběrového systému za použití aseptické techniky.

Sérum novorozených telat se získá z telat mladších dvaceti dnů a telecí sérum ze zvířat mladších dvanácti měsíců. Bovinní sérum se může získávat ze zvířat mladších třicetišesti měsíců, u kterých je dobře definován a doložen TSE negativní statut dárcovského stáda. Ve všech těchto případech se sérum odebírá v souladu se stanovenými postupy osobou, která je v těchto postupech vyškolená, aby se předešlo křížové kontaminaci tkáněmi vyššího rizika.

Pro krev a deriváty bovinní krve je třeba poskytnout dokumentaci dokazující shodu s touto statí, přičemž se berou v úvahu ustanovení uvedená v částech 3 až 5. Navíc by se měla věnovat pozornost následujícím požadavkům.

Dohledatelnost

Pro každou šarži séra nebo plazmy se musí zajistit dohledatelnost až na jatka, která musí mít k dispozici seznamy farem, ze kterých zvířata pocházejí. Jestliže sérum pochází z odběrů ze živých zvířat, musí být pro každou šarži séra k dispozici záznamy, které zaručují dohledatelnost na farmy.

Geografický původ

Zatímco BSE infekčnost u skotu je více omezena na určité tkáně než v případě klusavky, měla by se jako preventivní opatření bovinní krev získávat ze zemí kategorie A. Bovinní krev ze zemí kategorie B je také přijatelná za předpokladu, že neexistuje riziko křížové kontaminace krve mozkovou tkání při porážce zvířat starších 21 měsíců²⁶.

Metody omračování

Jestliže se vzorky odebírají z poražených zvířat, má způsob porážky význam pro zajištění bezpečnosti materiálu. Bylo prokázáno, že omračování upoutaným projektilem s nebo bez jádra, stejně jako pneumtickým omračovacím přístrojem, zejména jestliže je injektován vzduch, může rozrušit mozek a rozšířit mozkovou tkáň do krevního řečiště. Nepenetrující omračování se již nepovažuje za alternativu k penetrujícímu omračování, protože

²⁶ Stanovisko vědecké komise pro biologická nebezpečí k posouzení věkové hranice pro odstranění určitých specifikovaných rizikových materiálů u skotu. Otázka č. EFSA-Q-2004-146, přijatá dne 28. dubna 2005.

kontaminace krve mozkovou tkání již byla prokázána²⁷. Pouze se zanedbatelným rizikem lze počítat u elektronarkózy²⁸, ale ani ta nezajišťuje úplnou bezpečnost, protože pokud je provedena neúspěšně, je nutné zvířata dodatečně omračovat. Metody omračování proto musí být pro postup odběru bovinní krve popsány.

Pokud v zemích s kontrolovaným rizikem výskytu BSE (kategorie B) nelze při běžné porážce zabránit riziku křížové kontaminace krve mozkovou tkání, je třeba přijmout ochranná opatření, jako je věková hranice pro jednotlivé kusy skotu a/nebo snížení množství infekčních agens během výroby.

Věk

V zemích s kontrolovaným rizikem výskytu BSE (kategorie B) se pro bovinní krev a krevní deriváty, kdy nelze počítat s žádným výrazným snížením množství infekčních agens TSE během výroby, použije preventivní věková hranice 21 měsíců. Pro bovinní krevní deriváty, u kterých lze prokázat výrazné snížení množství infekčních agens TSE, jak je popsáno dále, se považuje za dostatečnou věková hranice 30 měsíců.

Snížení množství infekčních agens TSE během výroby

Pro krevní deriváty by se schopnost výrobního postupu snížit/odstranit infekční agens TSE měla odhadnout na základě hodnotících studií. Tento odhad může být založen na zveřejněných údajích nebo na vlastních údajích, pokud lze prokázat, že tyto údaje mají význam pro specifický výrobní postup. Pokud nelze vyvodit, že schopnost snížit množství je srovnatelná, doporučuje se výrobcům, aby provedli hodnotící studie pro konkrétní produkty. Šetření s využitím biochemických zkoušek mohou být dostatečná, pokud existují vědecké důkazy o tom, že existuje korelace mezi jejich výsledky a údaji o infekčnosti. Byly již vytvořeny obecné pokyny pro hodnotící studie týkající se snížení množství infekčních agens TSE²⁹. Pro studie hodnotící riziko krve kontaminované mozkovou tkání je vhodné použít uměle kontaminované modelové přípravky.

Tab. 1 *Koncepce přijatelnosti bovinní krve, séra a krevních derivátů*

Produkt	Fetální	Sérum	Sérum	Sérum	Sérum/plazma	Sérum/plazma	Deriváty	Deriváty
---------	---------	-------	-------	-------	--------------	--------------	----------	----------

²⁷ Pokyny WHO o distribuci infekčnosti tkání u přenosných spongiformních encefalopatií (2006), <http://www.who.int/bloodproducts/tse/WHO%20TSE%20Guidelines%20FINAL-22%20JuneupdatedNL.pdf>

²⁸ Zpráva pracovní skupiny EFSA o riziku BSE v souvislosti s rozšířením mozkových částic do krve a jatečně upraveného těla. Otázka č. EFSA-Q-2003-122 přijatá dne 21. října 2004, http://www.efsa.europa.eu/en/sciencebiohaz/biohaz_opinions/opinion-annexes/733.html

²⁹ Pokyny týkající se hodnocení výrobního postupu léčivých přípravků získaných z plazmy z hlediska rizika vCJD, CPMP/BWP/5136/03.

	sérum skotu	dárčovských telat	dospělých dárčovských kusů skotu	telat	dospělých kusů skotu	/deriváty séra dospělých kusů skotu	séra dospělých kusů skotu	séra dospělých kusů skotu	
Geografický původ skotu	kategorie A a B	kategorie A a B	kategorie A a B*	kategorie A a B	kategorie A	kategorie B	kategorie A	kategorie B	
Věk zvířat	nenarozená	< 1 rok	< 36 měsíců	< 1 rok	neomezeně	< 21 měsíc**	neomezeně	< 36 měsíců	
Kontaminace při porážce / křížová kontaminace krve materiálem CNS	bez rizika křížové kontaminace			riziko křížové kontaminace					
Důkaz snížení množství prionů při výrobě	ne			ne					ano***
<p>* Pokud bylo získáno v zemích kategorie B, skot by měl pocházet z dobře definovaných a dokumentovaných stád..</p> <p>** Může být povolen vyšší věk, pokud lze jasně vyloučit křížovou kontaminaci krve materiálem CNS (např. porážka v souladu s tradicí halal).</p> <p>*** Důkaz snížení množství prionů se nemusí vyžadovat, pokud lze jasně vyloučit křížovou kontaminaci krve materiálem CNS (např. porážka v souladu s tradicí halal).</p>									

6-4 DERIVÁTY LOJE

Lůj je tuk získaný ze tkání vyskytujících se v podkožních, břišních a mezisvalových oblastech a v kostech. Lůj použitý jako výchozí materiál pro výrobu derivátů je materiálem kategorie 3 nebo jeho ekvivalentem, jak je definováno v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 ze 3. října 2002, stanovujícím zdravotnické předpisy týkající se vedlejších živočišných produktů, které nejsou určeny pro lidskou spotřebu.

Deriváty loje, jako je glycerol a mastné kyseliny, vyrobené z loje přísnými postupy, jsou považovány za nepravděpodobně infekční a jsou předmětem specifické rozvahy vyjádřené CHMP a CVMP. Z tohoto důvodu se takovýto materiál, vyrobený za podmínek přinejmenším tak přísných, jako jsou podmínky dále uvedené, považuje za vyhovující této stati, bez ohledu na geografický původ a podstatu tkání, ze kterých jsou deriváty loje získány. Příklady přísných postupů jsou:

- transesterifikace nebo hydrolýza nejméně 20 min při nejméně 200 °C, pod tlakem (výroba glycerolu, mastných kyselin a esterů mastných kyselin);
- saponifikace roztokem NaOH (12 mol/l) (výroba glycerolu a mýdla):
 - výroba v šaržích: nejméně 3 h při nejméně 95 °C;
 - kontinuální výroba: nejméně 8 min při nejméně 140 °C, pod tlakem nebo ekvivalentně;
- destilace při 200 °C.

Deriváty loje vyrobené v souladu s těmito podmínkami pravděpodobně nemají žádné TSE riziko, a proto se považují za vyhovující této stati.

U derivátů loje vyrobených za jiných podmínek se musí prokázat shoda s touto statí.

6-5 ŽIVOČIŠNÉ UHLÍ

Živočišné uhlí se připravuje karbonizací živočišných tkání, jako jsou kosti, za použití vysoké teploty přesahující 800 °C. Pokud není zdůvodněno jinak, výchozím materiálem pro výrobu živočišného uhlí je materiál kategorie 3 nebo jeho ekvivalent, jak je definováno v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 ze 3. října 2002, stanovujícím zdravotnické předpisy týkající se vedlejších živočišných produktů, určených pro účely výživy lidí. Bez ohledu na geografický původ a podstatu tkáně, se živočišné uhlí považuje z hlediska shody předpisů za vyhovující této statí.

Živočišné uhlí vyrobené v souladu s těmito podmínkami pravděpodobně nepředstavuje žádné riziko TSE, a proto se považuje za vyhovující této statí. U živočišného uhlí vyrobeného za jiných podmínek se musí prokázat shoda s touto statí.

6-6 MLÉKO A DERIVÁTY MLÉKA

Na základě současných vědeckých poznatků a bez ohledu na geografický původ, nepředstavuje kravské mléko pravděpodobně žádné riziko kontaminace TSE³⁰.

Určité látky, včetně laktosy, se extrahují ze syrovátky, tekutiny z produkce sýrů po koagulaci. Při srážení se může používat telecí syřidlo, extrakt ze slezu nebo syřidlo získané z dalších přežvýkavců. CHMP/CVMP zhodnotily riziko pro laktosu a další deriváty syrovátky vyrobené za použití telecího syřidla a rozhodly, že riziko TSE je zanedbatelné, jestliže telecí syřidlo je vyrobeno v souladu s postupem popsáním ve zprávě o hodnocení rizika³¹. Závěr byl podpořen SSC³², který rovněž obecně hodnotil TSE riziko syřidla³³.

³⁰ Pokud jde o mléko a mléčné deriváty z malých přežvýkavců, viz stanovisko EFSA k otázce č. EFSA-Q-2008-310, přijaté dne 22. října 2008, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/849.htm>

³¹ Výbor pro humánní léčivé přípravky a jeho pracovní skupina pro biologické přípravky provedli posouzení rizik a posouzení z hlediska právních předpisů pro laktosu vyráběnou za použití telecího syřidla. Posouzení rizik zahrnuje i zdroje zvířat, vyříznutí slezů a dostupnosti dobře definovat postupy jištění jakosti. Jakost jakékoliv mléčné náhrady použité při krmení zvířat, ze kterých se používají slezy, je velmi důležitá. Zprávu je možno nalézt na internetových stránkách <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/press/pus/057102.pdf>

³² Prozatímní prohlášení týkající se bezpečnosti telecího syřidla pro výrobu laktosy bylo přijato na zasedání SSC 4. až 5. dubna 2002 (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out255_en.pdf).

³³ SSC vydal stanovisko týkající se bezpečnosti živočišných syřidel ve vztahu k rizikům přenosu TSE a zejména BSE ze zvířat, přijaté na jeho zasedání 16. května 2002, (http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out/265_en.pdf).

Deriváty kravského mléka vyrobené podle dále uvedených podmínek nemají pravděpodobně žádné riziko TSE, a proto se považují za vyhovující této stati.

- Mléko se získává ze zdravých zvířat za stejných podmínek jako mléko určené pro účely výživy lidí;
- žádné další materiály z přežvýkavců, s výjimkou telecího syřidla, se při přípravě těchto derivátů nepoužívají (např. pankreatický enzym štěpící kasein).

U derivátů mléka vyrobených za použití jiných postupů nebo za použití syřidla získaného z jiných druhů přežvýkavců se musí prokázat shoda s touto statí.

6-7 DERIVÁTY VLNY

Deriváty vlny a srsti přežvýkavců, jako jsou lanolin a alkoholy získané ze srsti, se považují za vyhovující této stati, pokud se vlna a srst získají ze živých zvířat.

Deriváty vlny z poražených zvířat prohlášených za „určené pro účely výživy lidí“, vyrobené výrobními postupy, které splňují nejméně jednu z dále uvedených dohodou stanovených podmínek zpracování ve vztahu k hodnotě pH, teplotě a délce ošetření, téměř určitě nemají žádné riziko TSE, a proto se považují za vyhovující této stati:

- ošetření nejméně 1 h při hodnotě pH větší nebo rovné 13 (počáteční; odpovídající koncentraci nejméně 0,1 mol/l NaOH) a při teplotě vyšší nebo rovné 60 °C. To se obvykle vyskytuje během refluxního stadia organicko-alkalického ošetření;
- molekulární destilace při teplotě vyšší nebo rovné 220 °C, za sníženého tlaku.

U derivátů vlny vyrobených za použití jiných podmínek se musí prokázat shoda s touto statí.

6-8 AMINOKYSELINY

Aminokyseliny se mohou získat hydrolýzou materiálů z různých zdrojů. Pokud není zdůvodněno jinak, výchozím materiálem pro výrobu aminokyselin je materiál kategorie 3 nebo ekvivalent, jak je definováno v nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 ze 3. října 2002, stanovujícím zdravotnické předpisy týkající se vedlejších živočišných produktů neurčených pro účely výživy lidí.

Aminokyseliny vyrobené za použití dále uvedených výrobních podmínek, téměř určitě nemají žádné riziko TSE, a proto se považují za vyhovující této stati:

- aminokyseliny vyrobené z usní a kůží postupem, který zahrnuje ošetření materiálu při hodnotě pH 1 až 2 následovaném ošetřením materiálu při hodnotě pH vyšší než 11, a dále tepelným ošetřením po dobu 30 min při 140 °C a tlaku 3 bary,
- výsledné aminokyseliny nebo peptidy musí být po výrobě filtrovány a
- provede se kontrola přítomnosti jakýchkoliv zbytkových makromolekul za použití validované a citlivé metody s vhodným limitem.

U aminokyselin vyrobených za použití jiných podmínek se musí prokázat shoda s touto statí.

6-9 PEPTONY

Peptony jsou částečně hydrolyzované bílkoviny získané enzymatickým rozkladem nebo rozkladem kyselinou. Používají se v mikrobiologických kultivačních médiích k podpoře výživových potřeb mikroorganismů, které se mohou použít jako zásoba inokula nebo při fermentaci v průmyslovém měřítku k produkci humánních a veterinárních léčivých přípravků, včetně vakcín. Je značný zájem na používání rostlinných bílkovin jako alternativy k bílkovinám živočišným, nicméně:

- pokud se jako zdroj bílkoviny používá želatina, vyhovuje části 6-2 (Želatina) této stati;
- pokud se jako zdroj bílkoviny používá kasein, vyhovuje části 6-6 (Mléko a deriváty mléka) této stati;
- pokud se jako zdroj bílkoviny používají tkáně TSE-relevantních živočišných druhů, musí se tyto tkáně získávat ze zvířat vhodných pro lidskou spotřebu (viz část 3-2 Zvířata jako zdroj této stati) ve věku nejvýše 30 měsíců v případě skotu ze země s kontrolovaným rizikem výskytu BSE (kategorie B). Věk zvířat nehraje roli u zvířat ze země se zanedbatelným rizikem výskytu BSE (kategorie A).

Příloha: Hlavní kategorie infekčnosti

Dále uvedené tabulky jsou upraveny podle *Pokynů WHO o distribuci infekčnosti tkání u přenosných spongiformních encefalopatií (2010)*.

Uvedené údaje jsou vyjádřeny následujícími symboly:

+ = výskyt infekčnosti nebo PrP^{TSE};

– = nepřítomnost zjiřitelné infekčnosti nebo PrP^{TSE};

NT = nezkoušeno;

NA = nepoužito;

? = nejistá interpretace;

() = omezené nebo předběžné údaje;

[] = infekčnost nebo PrP^{TSE} údaje založené výlučně na základě biologického stanovení u transgenních (Tg) myši exprimujících PrP kódující geny nebo metodami amplifikace PrP^{TSE}.

Kategorie IA: Tkáně s vysokou infekčností

Tkáně	Skot BSE	Ovce a kozy klusavka	Losi a jeleni chronické chřadnutí (CWD)
-------	-------------	-------------------------	---

	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}
mozek	+	+	+	+	+	+
mícha	+	+	+	+	NT	+
sítnice	+	NT	NT	+	NT	+
optický nerv ²	+	NT	NT	+	NT	+
míšní ganglia	+	+	+	+	NT	+
trigeminální ganglia	+	+	NT	+	NT	-
hypofýza ³	-	NT	+	+	NT	+
tvrdá plena ⁵	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Kategorie IB: Tkáně s nižší infekčností

Tkáň	Skot BSE		Ovce a kozy klusavka		Losi a jeleni chronické chřadnutí (CWD)	
	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}
periferní nervový systém						
periferní nervy	[+]	+	+	+	NT	+
autonomní ganglia ⁴	NT	+	NT	+	NT	+
lymforetikulární tkáň						
slezina	-	-	+	+	NT	+
mízní uzliny	-	-	+	+	NT	+
mandle	+	-	+	+	NT	+
mžurka	+	-	[+]	+	NT	+
brzlík	-	NT	+	+	NT	-
trávicí trakt⁵						
jícen	-	NT	[+]	+	NT	+
předžaludky ⁶ (pouze přežvýkavci)	-	NT	[+]	+	NT	+
žaludek/slez	-	NT	[+]	+	NT	+
dvanáctník	-	-	[+]	+	NT	+
lačnik ⁷	-	+	[+]	+	NT	NT
kyčelník ⁷	+	+	+	+	NT	+
apendix	NA	NA	NA	NA	NA	NA
tlusté střevo/slepé střevo ⁷	-	-	+	+	NT	+
konečník	NT	NT	NT	+	NT	+
reprodukční tkáň						
placenta ⁸	-	NT	+	+	NT	-
vaječník ³	-	NT	-	-	NT	-
děloha ³	-	NT	-	-	NT	-
ostatní tkáň						
mléčná žláza/vemeno ⁹	-	NT	-	+	NT	NT
kůže ^{3,10}	-	NT	-	+	[+]	[+]
tuková tkáň	-	NT	NT	NT	[+]	NT
srdce/osrdečník	-	NT	-	NT	NT	+
pľíce	-	NT	-	-	NT	+
játra ³	-	NT	+	-	NT	-
ledvina ^{3,11}	-	-	[+]	+	NT	+
nadledvina	[+]	+	+	-	NT	+
slinivka ³	-	NT	+	NT	NT	+
kostní dřev ¹²	[+]	NT	+	NT	NT	-
kosterní svalovina ¹³	[+]	NT	[+]	+	[+]	-
jazyk ¹⁴	-	NT	[+]	+	NT	-
krevní cévy	-	NT	NT	+	NT	-
čichová sliznice ¹⁵	-	NT	+	+	NT	+
slinná žláza	-	NT	+	NT	-	-
rohovka ¹⁶	NT	NT	NT	NT	NT	NT
tělní tekutiny, sekrety a exkreta						

mozkomíšni mok	–	NT	+	–	NT	NT
krev ¹⁷	–	?	+	?	+	?
sliny	NT	NT	–	NT	+	[–]
mléko ¹⁸	–	–	+	[+]	NT	NT
moč ¹⁹	–	NT	–	–	–[+]	[+]
výkaly ¹⁹	–	NT	–	NT	–[+]	NT

Kategorie IC: Tkáň s nezjištěnou infekčností

Tkáň	Skot BSE		Ovce a kozy klusavka		Losi a jeleni chronické chřadnutí (CWD)	
	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}	infekčnost ¹	PrP ^{TSE}
reprodukční tkáň						
varle	–	NT	–	–	NT	–
prostata/nadvarle/semenný váček	–	NT	–	–	NT	–
semeno	–	NT	–	–	NT	NT
placentární tekutiny	–	NT	NT	NT	NT	NT
plod ²⁰	–	NT	–	–	NT	(–)
embryo ²⁰	–	NT	?	NT	NT	NT
muskulo-skeletální tkáň						
kost	–	NT	NT	NT	NT	NT
šlacha	–	NT	NT	NT	NT	NT
jiné tkáň						
tkáň dásní	NT	NT	NT	NT	NT	NT
zubní dřev	NT	NT	NT	NT	NT	NT
průdušnice	–	NT	NT	NT	NT	–
štítná žláza	NT	NT	–	NT	NT	–
tělní tekutiny, sekrety, exkrekty						
mlezivo ²¹	(–)	–	(?)	NT	NT	NT
pupečnicková krev ²¹	–	NT	NT	NT	NT	NT
pot	NT	NT	NT	NT	NT	NT
slzy	NT	NT	NT	NT	NT	NT
nosní hlen	NT	NT	NT	NT	NT	NT
žluč	NT	NT	NT	NT	NT	NT

¹ Biologické zkoušky infekčnosti lidských tkání byly provedeny buď na primátech, nebo myších (nebo na obou druzích); biologické zkoušky infekčnosti tkání skotu byly provedeny buď na skotu, nebo myších (nebo na obou druzích) a většina biologických zkoušek tkání ovcí a/nebo koz byla provedena pouze na myších. U ovcí a koz nejsou pro oba živočišné druhy všechny výsledky shodné, např. dvě kozy (ale žádné ovce) se infikovaly BSE přirozenou cestou [Eurosurveillance, 2005, Jeffrey et al., 2006]. Podobně většina výsledků popsanych pro CWD byla odvozena ze studií o jelenech a zjištění nemusí být totožná pro losy nebo jiné jelenovité.

² U experimentálních modelů TSE se ukázalo, že oční nerv představoval cestu neuroinvaze a že obsahuje vysoké titry infekčnosti.

³ Nebyly uvedeny žádné experimentální údaje o infekčnosti lidské hypofýzy nebo tvrdé pleny mozkové; pokud jde o všechny formy lidské TSE, ale částmi kadaverózních tvrdých plen a růstovým hormonem získaným posmrtně z hypofýzy byla choroba přenesena na mnoho lidí, a proto musí být zařazeny do kategorie tkání s vysokým rizikem. Pr^{TSE} byl zjištěn metodou imunoblot v tvrdé pleni mozkové pacienta s vCJD, který zemřel v USA, po uplynutí neobvykle dlouhé inkubační doby (viz rovněž tabulka IB pro ostatní pozitivní tkáň: kůže, ledviny, játra, slinivka, vaječníky, děloha) [Notari et al., 2010]. Je třeba zmínit, že dřívější studie týkající se

četných případů zkoumaných ve Spojeném království uvádějí, že všechny tyto tkáně jsou negativní [Ironsides et al., 2002; Head et al., 2004].

- ⁴ U skotu se uvádí, že Pr^{TSE} je nestále přítomen ve střevní nervové pletení v distálním kyčelníku, ale imunohistologická zkouška tkání u jediného případu zvířat uhynulých v důsledku BSE v Japonsku naznačuje (i když bez určitosti) zapojení nervových pletení hladkého svalstva skrze tenké a tlusté střevo [Kimura a Haritani, 2008].
- ⁵ Pokud jde o vCJD, Pr^{TSE} se omezuje pouze na lymfatické a nervové tkáně související se střevem (sliznice, svalovina na seróza jsou negativní).
- ⁶ Předžaludky přežvýkavců (čepce, bachor a kniha) se široce konzumují, stejně jako skutečný žaludek (slez). Slez skotu (a někdy i ovcí) je také zdrojem syřidla.
- ⁷ Když byla při pokusné infekci skotu použita vysoká perorální dávka BSE, byla infekčnost zjištěna v lačniku a ileocekálním spojení u transgenních myši exprimujících PrP [Dr. M. Groschup]. Byla zjištěna nízká incidence Pr^{TSE} v lymfatické tkáni kyčelníku [Terry et al., 2003] a v ještě nižší frekvenci v lymfatické tkáni lačniku skotu infikovaného rovněž perorální cestou [EFSA, 2009].
- ⁸ Jediná zpráva o přenosu infekčnosti sporadické CJD z lidské placenty nikdy nebyla potvrzena a tento přenos se považuje za nepravděpodobný.
- ⁹ Pr^{TSE} byl zjištěn u ovcí s chronickou mastitidou infikovaných klusavkou, ale ne u infikovaných ovcí bez mastitidy [Ligios et al., 2005].
- ¹⁰ Studie provedené na křečcích infikovaných perorálně klusavkou odhalily, že uložení Pr^{TSE} v kůži se nacházelo primárně uvnitř malých nervových vláken. Rovněž se uvádí, že kůže na špicí paroží (lýčí) jelenů infikovaných CWD obsahuje Pr^{TSE} a infekčnost [Angers et al., 2009].
- ¹¹ Pr^{TSE} zjištěný imunocytochemicky v ledvinné pánvičce ovce infikované klusavkou [Siso et al., 2006] a v lymfatických folikulech v pojivové tkáni přiléhající k ledvinné pánvičce u jelence ušatého infikovaného CWD [Fox et al., 2006].
- ¹² Jediná pozitivní dřevň během několika pokusů o přenos ze skotu, kterému byl perorálně podán mozek infikovaný BSE [Wells et al., 1999; Wells et al., 2005; Sohn et al., 2009].
- ¹³ Svalové homogenáty nepřenesele onemocnění na primáty z lidí se sporadickou CJD, ani na skot ze skotu s BSE. Intracerebrální naočkování pološlachovitého svalového homogenátu (včetně nervových a lymfatických prvků) s jedné krávy s klinickou BSE však přeneslo onemocnění na transgenní myši exprimující PrP v poměru nasvědčujícím stopovému množství infekčnosti [Buschmann a Groschup, 2005]. Rovněž nedávno zveřejněné i nezveřejněné studie dokládají přítomnost Pr^{TSE} v kosterních svalech hlodavců u experimentálních modelů klusavky a vCJD [Beekers et al., 2005], u experimentálních a přirozených infekcí klusavky u ovcí a koz [Andreoletti et al., 2004], u ovcí, kterým byla perorálně podána BSE [Andreoletti nezveřejněné údaje] a u lidí se sporadickými iatrogenními a variantními formami CJD [Glatzel et al., 2003; Kovacs et al., 2004; Peden et al., 2006]. Biologické zkoušky svalů transgenních myši exprimujících PrP jelenovitých prokazují infekčnost u jelence ušatého infikovaného CWD [Angers et al., 2006] a probíhají pokusy pro určení toho, zda je s infekčností spojen i zjištělný PrP^{TSE} v jiných formách TSE.
- ¹⁴ U skotu byly biologické zkoušky infekčnosti v jazyku negativní, ale přítomnost infekčnosti v patrové mandli vzbudila obavy z možné infekčnosti ve tkáni kořene jazyka, která se ne vždy při porážce odstraňuje [Wells et

al., 2005; EFSA, 2008]. U ovcí přirozeně infikovaných klusavkou se u 7 z 10 zvířat vyskytoval zjištělý Pr^{TSE} v jazyku [Casalone et al., 2005; Corona et al., 2006].

¹⁵ Omezeno především na oblasti zapojené do čichových počitků.

¹⁶ Protože pouze jeden nebo dva případy iatrogenní CJD mezi stovkami tisíců příjemců byly věrohodně připsány transplantátům rohovky (další jeden případ se považuje za pravděpodobný a jeden pouze za možný), byla rohovka zařazena do kategorie tkání s nižším rizikem. Ostatní tkáně přední oční komory (čočka, komorová voda, duhovka, spojivka) byly vyšetřeny s negativním výsledkem na vCJD i ostatní humánní TSE a není žádný epidemiologický důkaz, že by souvisely s iatrogenním přenosem choroby.

¹⁷ Velké množství údajů ze studií o infekčnosti krve hlodavců u experimentálních modelů TSE bylo rozmnoženo o nedávné studie prokazující infekčnost v krvi ovcí s přirozeně se vyskytující klusavkou a u ovcí, kterým byla transfuzí dodána krev skotu infikovaného BSE [Houston et al., 2008], u jelenů s přirozeně se vyskytujícím CWD [Mathiason et al., 2006] a (na základě epidemiologických pozorování) ve fraksi erytrocytů (zahrnující značné množství plazmy i leukocytů) od čtyř dárců krve v preklinické fázi infekce vCJD [revidováno v Brown, 2006; Hewitt et al., 2006]. Podání plazmatického faktoru VIII se možná také podílelo na subklinickém případě vCJD u pacienta s hemofilií [Peden et al., 2010]. Neprokázalo se, že by se krví přenášelo onemocnění z člověka s jakoukoliv formou „klasické“ TSE [Dorsey et al., 2009], ani z dobytka s BSE (včetně fetální telecí krve). Některé laboratoře, které používají nové, vysoce citlivé metody zjišťování PrP^{TSE}, zaznamenávají úspěch u variant zvířecích a lidských TSE. Některé z nich však měly potíže při získávání reprodukovatelných výsledků u plazmy a ještě není jasné, že z pozitivních výsledků vyplývá potenciál pro přenos onemocnění buď z důvodů falešně pozitivních, nebo „pravdivě“ pozitivních výsledků, které byly získány na základě koncentrací PrP^{TSE} pod hranici přenosnosti. Na základě těchto úvah (a skutečnosti, že ještě nejsou k dispozici žádné údaje o slepých zkouškách vzorků z přirozeně infikovaných lidí nebo zvířat) dospěla skupina odborníků k názoru, že ještě příliš brzy na to, aby mohla být zhodnocena platnost těchto zkoušek s dostatečnou jistotou, která by umožnila negativní nebo pozitivní závěr.

¹⁸ Důkaz, že infekčnost není přítomná v mléce skotu infikovaného BSE, zahrnuje časově-prostorová epidemiologická pozorování, při nichž nebyl zjištěn přenos z matky na telata, která byla živena kravami po dlouhou dobu. Klinická pozorování více než stovky telat živených infikovanými kravami, u kterých nedošlo k rozvoji BSE, a experimentální pozorování toho, že mléko z infikovaných krav chovaných do věku překračujícího minimální inkubační dobu nepřeneslo onemocnění, když bylo podáno intracerebrálně nebo perorálně myším [Middleton a Barlow, 1993; Taylor et al., 1995]. PrP^{TSE} nebyl zjištěn ani v mléce skotu inkubovaného BSE po experimentálním podání perorální cestou [SEAC, 2005]. Byly však zjištěny nízké hladiny (µg/l až ng/l) běžného PrP^{TSE} v mléce zvířat i lidí [Franscini et al., 2006]. PrP^{TSE} byly zjištěny v mléčných žlázách ovcí s chronickou mastitidou infikovaných klusavkou [Ligios et al., 2005] a zcela nedávno bylo zjištěno, že mlékem (které v některých případech obsahovalo také mlezivo) ovcí infikovaných klusavkou se onemocnění přeneslo na zdravá zvířata [Konold et al., 2008; Lacroux et al., 2008].

¹⁹ Smíšeným inokulem moči a výkalů z jelenů přirozeně infikovaných CWD se onemocnění nepřeneslo během 18měsíčního období pozorování zdravého jelena po naočkování heterozygotním (96 G/S) genotypem PRNP [Mathiason et al., 2006]. Nedávné biologické zkoušky u transgenních myši však přenesly onemocnění jak z moči [Haley et al., 2009], tak z výkalů [Tamgüney et al., 2009]. Kromě toho myši s lymfocytární nefritidou, které byly pokusně infikovány klusavkou, vylučovaly močí PrP^{TSE} i infekčnost během biologických zkoušek u

transgenních myší [Seeger et al., 2005]. Velmi nízká míra infekčnosti byla také zjištěna v moči (a histologicky normálních) ledvinách křečků pokusně infikovaných klusavkou [Gregory a Rohwer, 2007; Gonzales-Romero et al., 2008]. Kromě toho v experimentálním modelu klusavky u křečků byly výsledkem perorálního podání infekční výkaly během biologických zkoušek u transgenních myší exprimujících PrP [Safar et al., 2008].

²⁰ Embrya skotu infikovaného BSE nepřenesla onemocnění na myši, ale zjišťování infekčnosti nebylo prováděno z jiných tkání telecích plodů než z krve (negativní biologický pokus na myších) [Fraser a Foster, 1994]. Telata narozená samicím, které dostaly embrya skotu infikovaného BSE, přežila během období pozorování v délce až sedmi let a vyšetření mozků nepostížených samic a jejich telat neodhalilo žádnou spongiformní encefalopatii ani PrP^{TSE} [Wrathall et al., 2002].

²¹ První zprávy o přenosu infekčnosti sporadické CJD z lidské pupečnickové krve a mleziva nebyly nikdy potvrzeny a jsou považovány za nepravděpodobné. Biologická zkouška z krávy s BSE u transgenních myší exprimujících PrP skotu poskytla negativní výsledek [Buschmann a Groschup, 2005] a PrP^{TSE} nebyl zjištěn v mlezivu skotu inkubovaného BSE po experimentálním podání perorální cestou [SEAC, 2005].