Refertazione delle indagini diagnostiche per Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile

Test rapidi

1. Sono eseguibili i campioni relativi ai capi soggetti a sorveglianza attiva, nel dettaglio:

   BSE

   a) bovini nati negli Stati Membri elencati nell'Allegato della Decisione della Commissione 2009/719/UE e s.m.i. (Dec. 2013/76/UE, Nota Ministero della Salute 11885 del 12/06/2013) di età superiore o uguale a quella prevista da normativa nazionale e comunitaria vigente (ora 48 mesi) soggetti:

      - alla **macellazione d'urgenza** o che,

      - presentano segni di incidenti, gravi problemi fisiologici e funzionali ad un esame *ante mortem* (**macellazione differita**), quali descritti nell'allegato III, capitolo A, parte I, punto 2.1, del regolamento (CE) n. 999/2001 e gli animali con segni clinici o sospetti di malattie trasmissibili all'uomo o gli altri animali (sono esclusi gli animali abbattuti nelle campagne di eradicazione),

      - **morti** oppure **abbattuti** come descritti nell'allegato III, capitolo A, parte I, punto 3.1, del regolamento (CE) n. 999/2001;

   b) bovini nati al di fuori degli Stati Membri elencati nell'Allegato della Decisione della Commissione 2009/719/UE e s.m.i. (Dec. 2013/76/UE, Nota Ministero della Salute 11885 del 12/06/2013):

      - **morti, macellati d'urgenza, macellati "in differita"** (categorie a rischio) di età superiore o uguale a quella prevista da normativa comunitaria vigente (ora 24 mesi) quali descritti nell'allegato III, capitolo A, parte I, punto 2.2 del regolamento (CE) n. 999/2001;

      - **regolarmente macellati** di età superiore o uguale a quella prevista da normativa comunitaria vigente (ora 30 mesi) quali descritti nell'allegato III, capitolo A, parte I, punti 2.1 e 3.1 del regolamento (CE) n. 999/2001.

SCRAPIE

a) ovini e caprini **macellati per il consumo umano** di età superiore o uguale a quella prevista da normativa nazionale e comunitaria vigente (ora 18 mesi) quali descritti nell'allegato III, capitolo A, parte II, punto 2 del regolamento (CE) n. 999/2001;
b) ovini e caprini trovati **morti o abbattuti per motivo diverso da TSE** di età superiore o uguale a quella prevista da normativa nazionale e comunitaria vigente (ora 18 mesi) quali descritti nell'allegato III, capitolo A, parte II, punto 3 del regolamento (CE) n. 999/2001;
c) ovini e caprini di età superiore o uguale a quella prevista da normativa nazionale e comunitaria vigente (ora 18 mesi) **abbattuti per essere distrutti o macellati** in conformità delle disposizioni di cui al capitolo B, parte 2, punto 2.2.1 e punto 2.2.2, lettera b) o c), dell'allegato VII.

2) I campioni eseguibili devono essere definiti come "**non valutabili**" qualora l'obex sia mancante o non identificabile. In particolare devono essere distinti nel rapporto di prova:
   - campioni **Non valutabili per obex non identificabile,** qualora il prelievo non sia stato eseguito correttamente;
   - campioni **Non valutabili per autolisi** qualora il cattivo stato di conservazione del campione non consenta il riconoscimento dell'obex.

3) Devono essere considerati "**non eseguibili**" i campioni sottoposti ad accettazione:
   a. non rientranti nei parametri di cui al precedente punto 1);
   b. fuori dal campo di applicazione del metodo per assenza di tessuto nervoso;
   c. sottoposti ad accettazione ma non pervenuti in laboratorio (es. contenitore vuoto);
   d. da inviare al CEA per materiale insufficiente;
   e. da inviare al CEA perché completamente fissati in formalina.

4) Relativamente alla trasmissione mensile dei dati della sorveglianza attiva al BEAR tramite **webupload**, le codifiche riguardanti il campo "esito della prova" del flusso dati, attualmente previste (P, per positivo; N, per negativo; X , per non valutabile) e riportate nel tracciato record disponibile all'url: http://webupload.izsto.it/upload/, dal 01/07/2018 verranno modificate come segue:

A ---> Non valutabile per autolisi

B ---> Non valutabile per obex non identificabile

N ---> per negativo;

P ---> per positivo;

NB: relativamente alla trasmissione mensile dei dati della sorveglianza attiva al BEAR tramite webupload, qualora un campione di tessuto nervoso proveniente da animali **non** soggetti a

sorveglianza attiva (inclusi i capi sotto età diagnostica in caso di sospetto) venisse comunque sottoposto a test rapido, allora si inserisca il codice **A, B**, **N, P** a seconda del risultato analitico ottenuto, nel campo "*Esito della prova*" del flusso dati webupload (http://webupload.izsto.it/upload/).

Le indicazioni pratiche sono riportate in tabella:

Descrizione del campione		IIZZSS: Come agire	Cosa riportare nel campo "*Esito*" del rapporto di prova del test rapido	Cosa inserire nel campo "*Esito della prova*" del flusso dati webupload (http://webupload.izsto.it/upload/)
Tessuto nervoso proveniente da animale soggetto a sorveglianza attiva	Obex riconoscibile	Effettuare il test rapido	**Positivo** **Negativo**	P N
	Obex non identificabile per prelievo non eseguito correttamente	Effettuare il test rapido	In caso di esito negativo, riportare: **Non valutabile per obex non identificabile** * Test eseguito su porzione non riconoscibile come area target (Regolamento CE 999/2001, All. 10, Cap. C, punto1)	B
	Obex non identificabile per autolisi del campione	Effettuare il test rapido	In caso di esito negativo, riportare: **Non valutabile per autolisi** * Test eseguito su porzione non riconoscibile come area target (Regolamento CE 999/2001, All. 10, Cap. C, punto1)	A
	Obex non identificabile	Effettuare il test rapido	In caso di esito positivo, riportare: **Positivo**	P
	Tessuto nervoso assente	**NON** effettuare il test rapido ma produrre il RdP	**Non eseguibile** * Fuori dal campo di applicazione del metodo (assenza di tessuto nervoso)	Non essendo effettuato il test rapido, non viene trasmesso al BEAR con web upload
	Materiale insufficiente (inferiore ad 1g)	**NON** effettuare il test rapido ma inviare il campione al CEA	**Non eseguibile** *Materiale insufficiente	
	Completamente fissato in formalina	**NON** effettuare il test rapido ma inviare il campione al CEA	**Non eseguibile** *Fissato in formalina	
	Non pervenuto in laboratorio	**NON** effettuare il test rapido ma produrre il RdP	**Non eseguibile** *Campione non pervenuto	
Tessuto nervoso proveniente da animali **NON** soggetti a sorveglianza attiva	Sotto età diagnostica	**NON** effettuare il test rapido	**Non eseguibile** * Fuori dal campo di applicazione del piano di campionamento (sotto età diagnostica)	
	Altro	**NON** effettuare il test rapido	**Non eseguibile** * Fuori dal campo di applicazione del piano di campionamento	

* Da riportare nel campo note del Rapporto di Prova

Conferme CEA

Il Centro per le Encefalopatie Animali (CEA) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, in qualità di laboratorio di riferimento nazionale, ha il compito di accertare la presenza di una EST ricorrendo ad almeno uno dei metodi e protocolli analitici descritti nel manuale OIE (Reg. CE 999/2001- allegato X, Capitoli A e C).

Flusso dei campioni inviati al CEA

Sorveglianza passiva

In caso di sospetti clinici ufficiali di EST, l'IZS competente deve provvedere all'invio dell'encefalo al CEA seguendo le procedure tecniche di campionamento riportate nella nota ministeriale DGSA 0020017-P-16/11/2011.

Sorveglianza attiva

In caso di esito positivo o non conclusivo al test rapido per BSE o Scrapie tutti i tessuti disponibili (tronco encefalico, cervelletto, encefalo) devono essere inviati immediatamente al CEA per l'espletamento delle conferme diagnostiche.

Indagini diagnostiche espletate dal CEA

Il CEA provvede a confermare i casi sospetti di BSE o di Scrapie basando le indagini diagnostiche sui seguenti tre metodi analitici:

1. metodo immunoistochimico (IHC);
2. Western Blot;
3. esame istologico.

Il giudizio diagnostico conclusivo si basa su un esito certo di **almeno uno dei tre test di conferma**. Lo stesso viene inoltre esplicitato dal CEA nella lettera di comunicazione ufficiale degli esiti in accompagnamento ai rapporti di prova.

Possibili esiti dei test di conferma e significato

Esame diagnostico	Esito	Descrizione esito
Istologico (campione in formalina)	**Positivo**	Presenza di vacuolizzazione neuronale e/o spongiosi del neuropilo
	Negativo	Assenza di vacuolizzazione neuronale e/o spongiosi del neuropilo
	Non valutabile	Scarsa rappresentazione dei siti target / autolisi / congelamento
	Non conclusivo	Insufficiente vacuolizzazione del neuropilo
Immunoistochimico (campione in formalina)	**Positivo**	Presenza depositi di proteina prionica patologica (PrP^{Sc})
	Negativo	Assenza di depositi di PrP^{Sc}
	Non valutabile	Scarsa rappresentazione dei siti target / autolisi / congelamento
	Scrapie atipica	Presenza di depositi di proteina prionica patologica (PrP^{Sc}) con pattern diverso dalla srapie classica
Western Blot (campione congelato)	**Positivo**	Presenza di tre bande di PrP^{Sc} (30-20 kDa)
	Scrapie atipica	Presenza di bande di PrP^{Sc} (30-12kDa)
	Negativo	Assenza di PrP^{Sc} a livello di obex
	Non valutabile	Assenza di obex /obex non riconoscibile
	Non eseguibile	Sospetta cross-contaminazione/campione fissato in formalina

<u>Azioni da intraprendere a fronte di esiti conclusivi delle conferme diagnostiche</u>

Campione positivo e campione di scrapie atipica: se <u>il risultato di uno dei tre esami di conferma è positivo o di scrapie atipica</u> l'animale deve essere considerato un caso positivo di EST. Questo comporta l'apertura del focolaio e la sua gestione ai sensi dell'Allegato VII, Capitolo A e Capitolo B del Regolamento (CE) 999/2001.

<u>Nel caso di scrapie atipica</u> il referto dell'esame western blot e/o Immunoistochimico del CEA sarà sufficiente a revocare le misure sanitarie sul latte all'interno dell'azienda in cui è stata identificata la positività. Sulla base del Regolamento (CE) 999/2001 (Allegato X, Capitolo C) per i casi di scrapie atipica non è necessario procedere alla caratterizzazione molecolare della proteina prionica patologica per escludere l'agente della BSE.

Campione negativo: se il risultato dei tre esami di conferma è negativo, oppure se il risultato di almeno uno dei tre esami di conferma è negativo in presenza di esito non conclusivo o non valutabile dei restanti esami di conferma, l'animale deve essere considerato esente da EST e pertanto si procede con la revoca di tutte le misure adottate nei confronti dell'azienda di provenienza del caso.

Campione non valutabile/non eseguibile: se nessuno degli esami di conferma consente di giungere ad un giudizio diagnostico conclusivo deve essere intrapresa nei confronti dell'azienda di provenienza dell'animale una **"sorveglianza controllata" ovvero, esecuzione di test rapidi sugli animali morti e regolarmente macellati dell'azienda di origine del capo, per un periodo di un anno dal referto del CEA**

CEA CONFERMA DIAGNOSTICA

Campione negativo			
WB	-	NV	-
IHC	-	-	NV
HP	-	NC	NV

Scrapie atipica						
WB	+	+	+	+	-	+
IHC	+	+	+	-	+	NV
HP	+	-	NC	NC	NC	NV

Campione non valutabile o non eseguibile	
WB	NV/NE
IHC	NV
HP	NV

Campione positivo						
WB	+	+	+	+	-	+
IHC	+	+	+	-	+	NV
HP	+	NV	NC	NC	NC	NV

CAMPIONE CONFERMATO INVIO A ISS

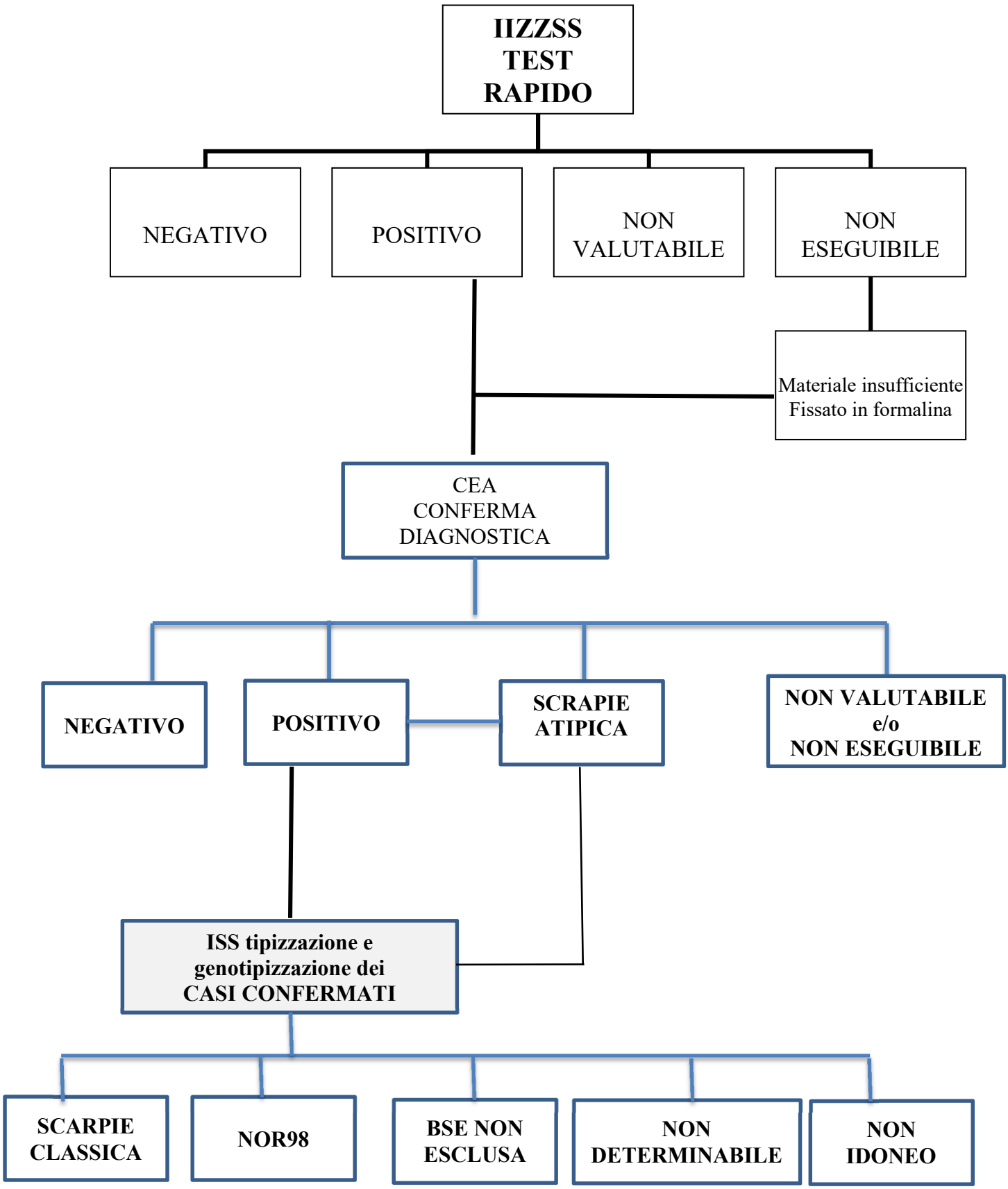
Apertura focolaio
All. VII Cap. A e B Reg. CE 999/2001

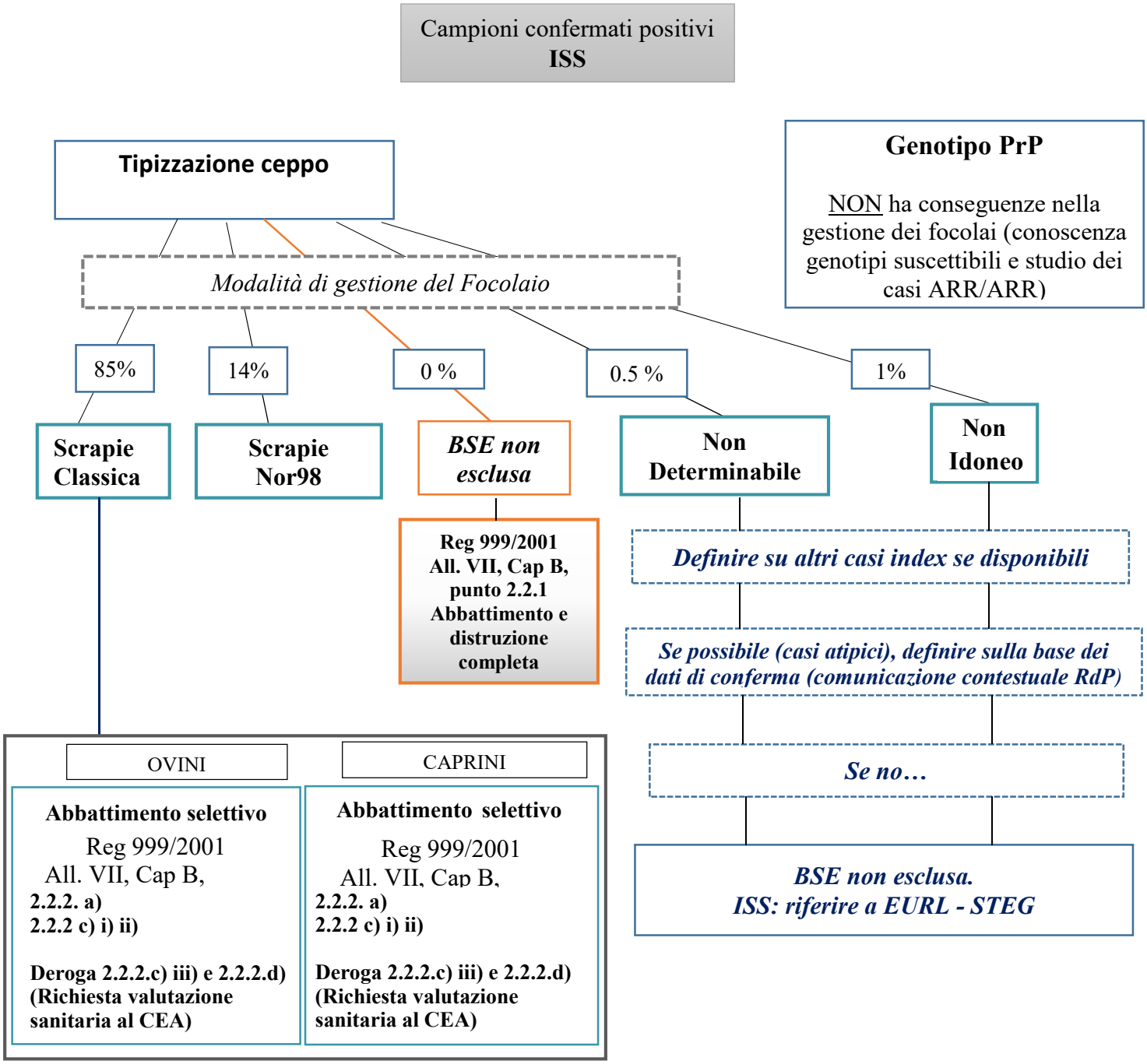
Revoca di tutte le misure adottate

Sorveglianza controllata
Test rapido sugli animali di età > ai 18 mesi macellati e morti per un anno .

WB: esame western blot; IHC: esame immunoistochimico; HP: esame istologico;
NC: esito non conclusivo; NV: campione non valutabile; NE: non eseguibile

ITER DIAGNOSTICO DELLE EST





N.B L'abbattimento totale dei capi ovini e caprini, salvo il caso di cui al punto 2.2.1 Cap.B All. VII del Reg.999/2001, può essere applicato solo per motivata ragione che impedisca la custodia degli animali o ne comprometta il loro benessere. Deve essere fatta comunicazione della misura intrapresa al CEA e Ministero della salute