



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST): integrazione fra territorio e laboratorio

Paola Marconi

*Progetto Formativo Aziendale
Aggiornamenti normativi e ricadute operative dei piani di emergenza e sorveglianza in sanità animale
8 e 29 ottobre 2021*





- Un esempio di prolungata ed intensa collaborazione tra strutture sanitarie
- Un percorso tracciato dalla continua evoluzione epidemiologica, dai risultati scientifici, dai progressivi aggiornamenti tecnici e normativi
- Un ambito sanitario condiviso tra competenze mediche e veterinarie in stretta connessione
- Un agente eziologico da indagare
- Una gestione del rischio complessa ed in continuo aggiornamento
- Risultati concreti ai fini della eradicazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Campionamento
Flusso dei campioni
Valutazione dei campioni in laboratorio
Iter di conferma
Valutazione degli esiti





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



CAMPIONAMENTO



CRITERI di CAMPIONAMENTO BOVINO

PROVENIENZA	CATEGORIA	ETÀ dei soggetti sottoposti a TEST	CHIARIMENTO MINISTERIALE
Nati e allevati in PAESI in lista di cui alla DEC 2009/719/CE Belgio - Repubblica ceca - Danimarca - Germania - Estonia - Irlanda - Grecia - Spagna — Francia — Croazia - Italia - Cipro - Lettonia - Lituania — Lussemburgo - Ungheria - Malta - Paesi Bassi - Austria - Polonia - Portogallo - Slovacchia - Slovenia - Finlandia - Svezia - isole Normanne e isola di Man (elenco aggiornato con Decisione di esecuzione (UE) 2016/851)	animali REGOLARMENTE MACELLATI	NON SI EFFETTUANO TEST	DEC 2013/76/CE in vigore dal 01/07/2013 DGSAF11885 del 12/06/2013
	categorie a RISCHIO (MORTI, MACELLATI URGENZA E DIFFERITI (non sono a rischio i differiti per BRC e TBC)	TEST su animali di età > 48 MESI	DGSAF17094 del 06/09/2013 – e-mail MIN SAL del 17/06/2013
Nati o allevati in PAESI NON in lista di cui alla DEC 2009/719/CE, tra i quali: ROMANIA, BULGARIA, Paesi Terzi (Gran Bretagna) e San Marino	animali REGOLARMENTE MACELLATI	TEST su animali di età > 30 MESI	DEC 2013/76 CE in vigore dal 01/07/2013 DGSAF17094 del 06/09/2013
	categorie a RISCHIO (MORTI, MACELLATI URGENZA, DIFFERITI (NON sono a rischio i differiti per BRC e TBC)	TEST su animali di età > 24 MESI	e-mail MIN SAL del 17/06/2013 DGSAF 28092 del 24/12/2020
QUALUNQUE PROVENIENZA	con segni clinici o sospetti di malattie trasmissibili Allegato A DGSAF 28092 del 24/12/2020	TEST sugli animali di TUTTE le ETÀ	DGSAF 17094 del 06/09/2013 DGSAF 28092 del 24/12/2020



CAMPIONAMENTI OVINO/CAPRINO

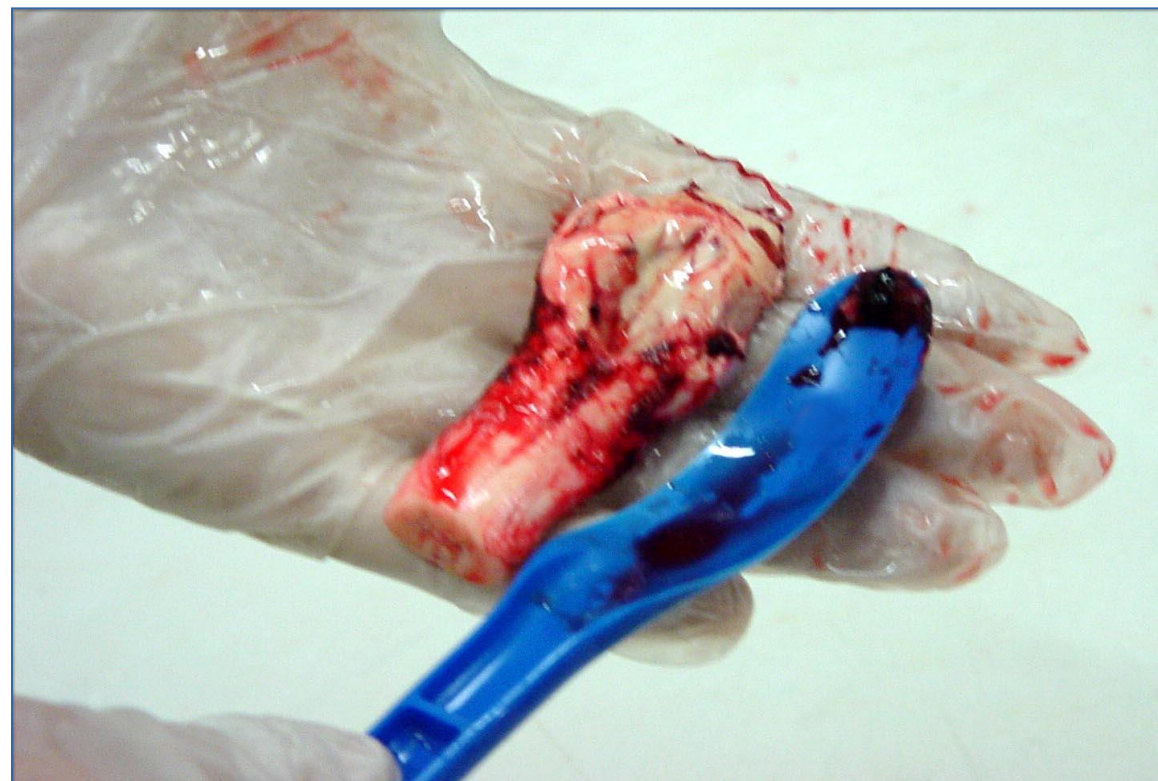
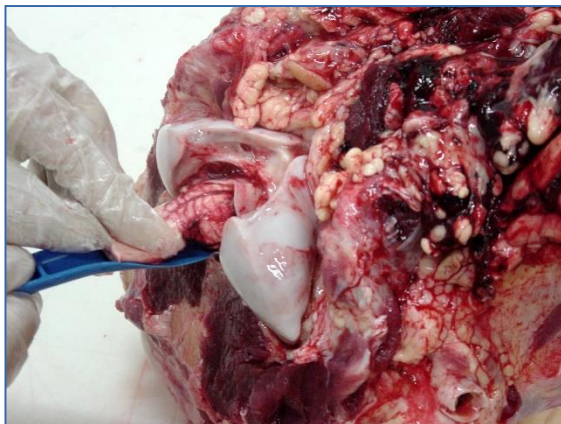
Sorveglianza Passiva		
SOSPETTO CLINICO	TIPO DI CAMPIONE	LAB. DIAGNOSTICO COMPETENTE
Segnalazione sintomi neurologici scrapie/BSE	Intera testa Tronco encefalico	IZSPLVA CEA 1a istanza e conferme ISS Car. molecolare Genotipizzazione

Sorveglianza Attiva			
REGOLARMENTE MACELLATI	>18 mesi Programmazione regionale	Tronco encefalico	IZSLT Lab. TSE Test Rapidi
TROVATI MORTI	>18 mesi Programmazione regionale	Tronco encefalico/Intera testa	IZSPLVA CEA Conferme ISS Caratterizzazione mol. Genotipizzazione

Conferimento: sede territorialmente competente/ Lab. IZSLT



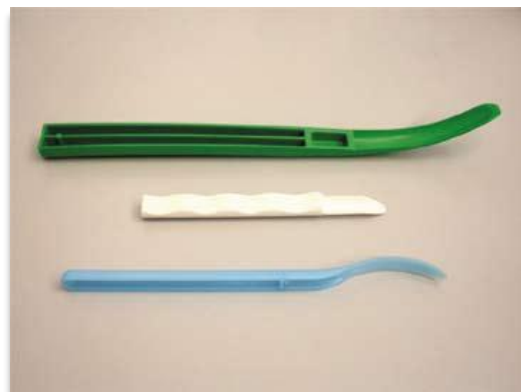
Prelievo al macello





MATERIALE PRELIEVI

Usare strumenti di prelievo idonei
per l'integrità del prelievo e
la sicurezza degli operatori

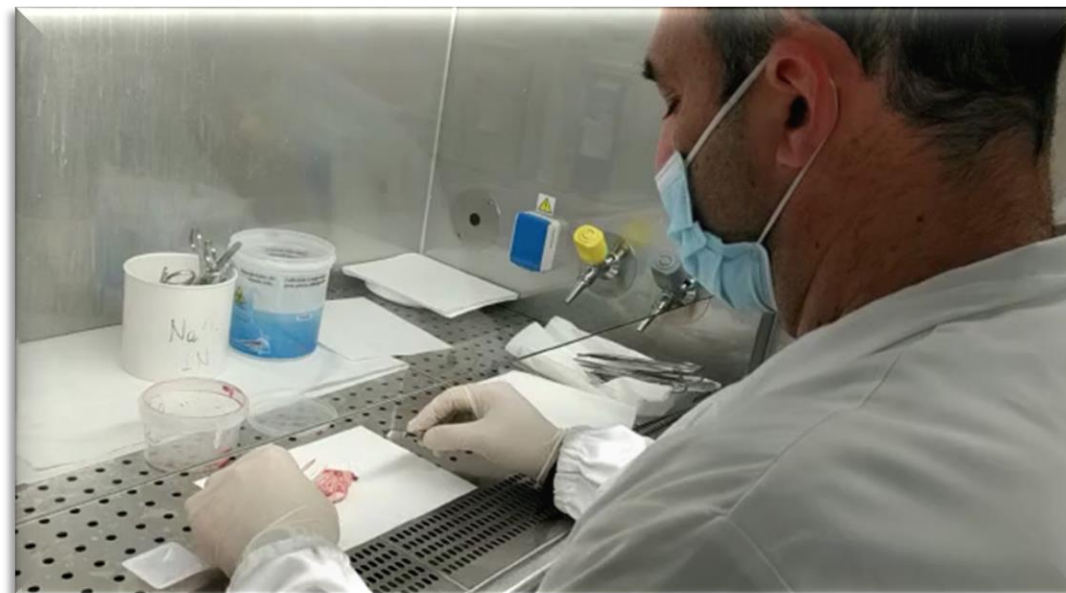


RACCOMANDAZIONI

- *Evitare cross contaminazioni tra i prelievi*
- *Adottare misure di sicurezza per operatori*
- *Identificare e richiudere correttamente i contenitori*
- *Mantenere integrità anatomica ove possibile*



La correttezza del prelievo in campo o al macello è essenziale per un buon campionamento in laboratorio per la zona target



Sistema nazionale di Sorveglianza epidemiologica della Scrapie: SCHEDA DI ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONI

Verbale n.	ASL	Prelevatore	Data prelievo
------------	-----	-------------	---------------

Luogo di prelievo: allevamento; macello; altro; e Ragione Sociale:

[illegible][illegible]

(1) Non compilare nel caso di prelievo eseguito in allevamento
(il dato è già presente alle voci precedenti)

NB In caso di mancanza del dato relativo all'anno di nascita, indicare l'anno di nascita presuntivo in base alla dentizione verificando comunque la presenza del 2° incisivo permanente

Firma
del Titolare dell'Impianto

(2) Per il motivo del prelievo utilizzare i seguenti codici:

- 1** macellazione per il consumo umano (età superiore a 18 mesi)
- 2** morte in allevamento o nel trasporto (età superiore a 18 mesi)
- 3** abbattimento per TSE (in caso di sospetto o estinzione del focolaio)
- 4** abbattimento per malattia diversa da TSE (età superiore a 18 mesi), ma non nel quadro di un'epidemia (es. non per Afta epizootica)

Veterinario prelevatore
Timbro e Firma

Sistema nazionale di Sorveglianza epidemiologica della BSE: SCHEDA DI ACCOMPAGNAMENTO CAMPIONI

Verbale n. _____ ASL _____ Prelevatore _____ Data prelievo | | | | | |

Luogo di prelievo: allevamento; stalla di sosta; macello; altro; e denominazione: _____

Num. Autorizzazione/ Codice azienda		Comune		Provincia
-------------------------------------	--	--------	--	-----------

N. progr.	Codice identificativo animale	Codice azienda o Paese estero di provenienza	Motivo del prelievo (1)	Data di nascita	Sesso M F	Nazionalità di nascita	Detentore ultima azienda di provenienza	Comune ultima azienda di provenienza
							è possibile omettere il dato in caso di macellazioni regolari	
1				/ /				
2				/ /				
3				/ /				
4				/ /				
5				/ /				
6				/ /				
7				/ /				
8				/ /				
9				/ /				

(1) Riportare i seguenti codici (se l'animale rientra in più categorie inserire i codici corrispondenti separati da punto e virgola):

- | | | | |
|---|-------------------------------|---|---|
| 1 | età superiore a * | macellato regolarmente | |
| 2 | età superiore a ** | soggetto a macellazione d'urgenza | 7 animale presente nell'azienda infetta |
| 3 | età superiore a ** | soggetto a macellazione differita | 8 animale figlio dell'animale infetto |
| 4 | animale sospetto clinicamente | | 9 animale esposto al medesimo rischio alimentare (coetaneo $\pm$ 12 mesi) |
| 5 | età superiore a ** | morto in allevamento o durante il trasporto | |

N.B. per le categorie 2,3,5 indicare la causa:

Firma
del Titolare dell'Impianto

Veterinario
Timbro e Firma

* 72 mesi per i capi nati nei Paesi **INCLUSI** nella lista della Dec 2011/358/EU; 30 mesi per i capi nati nei Paesi **ESCLUSI** dalla lista della Dec 2011/358/EU
 ** 48 mesi per i capi nati nei Paesi **INCLUSI** nella lista della Dec 2011/358/EU; 24 mesi per i capi nati nei Paesi **ESCLUSI** dalla lista della Dec 2011/358/EU



[illegible]

I dati riportati dal prelevatore sono utilizzati
-per il processo di accettazione IZSLT
-sono inseriti a sistema nell'archivio nazionale

Accettazione da remoto Siev





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



FLUSSO DEI CAMPIONI



Richieste urgenti:
*trasporti tassativi con preavviso
del prelevatore al laboratorio*

SEZIONE / SEDE di:  ISTITUTO ZOOPROFILATTICO Sperimentale
DELLE REGIONI LAZIO E TOSCANA

**CAMPIONI DIAGNOSTICI
TRONCO ENCEFALICO**

**destinati a:
LABORATORIO TSE
FIRENZE**

SEZIONE DI FIRENZE - 50100 via di Castelpulci, 43
Tel. 055/721308

Contenere materiale diagnostico refrigerato.
Mantenere il contenitore in posizione verticale.

 RISCHIO BIOLOGICO In
aso di contaminazione





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

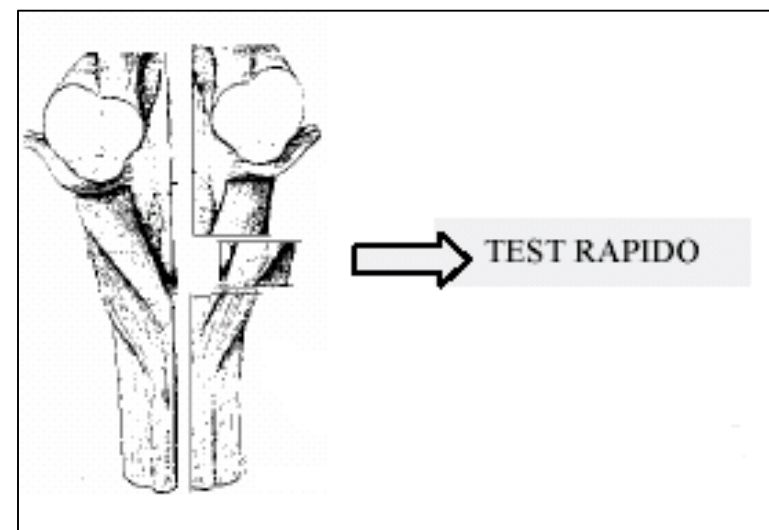


VALUTAZIONE DEI CAMPIONI IN LABORATORIO



Valutazione Campioni inviati al laboratorio

DESCRIZIONE DEL CAMPIONE		AZIONI
Tessuto nervoso proveniente da animale soggetto a sorveglianza attiva	Obex riconoscibile	Effettuare il Test Rapido
	Obex non identificabile	Effettuare il Test Rapido
	Obex non identificabile per autolisi del campione	Effettuare il Test Rapido
	Obex per prelievo non eseguito correttamente	Effettuare il Test Rapido
	Tessuto nervoso assente	Non effettuare il Test Rapido ma produrre il Rapporto di Prova
	Materiale insufficiente (< 1gr)	Non effettuare il Test Rapido ma inviare il campione al CEA
Tessuto nervoso proveniente da animali NON soggetti a sorveglianza attiva	Completamente fissato in formalina	Non effettuare il Test Rapido ma inviare il campione al CEA
	Non pervenuto in laboratorio	Non effettuare il Test Rapido ma produrre il Rapporto di Prova
	Sotto età diagnostica	Non effettuare il Test Rapido
	Altro	Non effettuare il Test Rapido





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

IL TEST DIAGNOSTICO RAPIDO

KIT PER IL TEST DELL'ANTIGENE DELLA BSE/SCRAPIE HERDCHEK (LABORATORI IDEXX)

«Immuno-dosaggio con impiego di un polimero chimico per la cattura selettiva della PrPSc e un anticorpo monoclonale di rilevazione diretto contro le regioni conservate della molecola della PrP»

Test uniformato a livello Nazionale

Procedura validata e sottoposta a verifica periodica con Ring test Nazionale annuale e prove di performance

Attività di Prova sottoposta a Carte di Controllo

Effettuato in laboratorio accreditato sottoposto a verifica periodica CEA e Accredia

Eseguita da personale addestrato (formazione specifica)

Tempo di esecuzione 24-48 ore dall'arrivo del campione in laboratorio

I laboratori di rete IZS sono sottoposti ad attività di uniformazione MINISTERIALE gestita da CEA





Relazione tra qualità del campione/azioni/esito/flusso dati

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	
	Sotto età diagnostica	NON effettuare il test rapido	Non eseguibile * Fuori dal campo di applicazione del piano di campionamento (sotto età diagnostica)	
Tessuto nervoso proveniente da animali NON soggetti a sorveglianza attiva	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





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

UOT TOSCANA CENTRO - SEDE DI FIRENZE

50010 via di Castelnuovi, 43 - Tel. 055/721308- Fax 055/7311323
E-mail: firenze@izs.tosc.it pec.firenze@izs.tosc.it

Resp Dott. Giovanni Brajon

Firenze,

Prot. N.

Spett.le
Ministero della Salute
DANSPV Dipartimento
Alimenti, Nutrizione e Sanità
Pubblica Veterinaria
P.le Marconi, 25
00144 Roma Eur

Regione Toscana
Settore Servizi Prevenzione in
Sanità Pubblica e Veterinaria
Politiche per la Salute
Via Alderotti, 26/n
50139 Firenze

Regione Lazio
Area Sanità Veterinaria
Via Rosa Raimondi Garibaldi, 7
XII piano Sala Garisano
00145 Roma

ASL
Responsabile Servizi Veterinari

CEA
Centro di Referenza Nazionale
Per le Encefalopatie Animali
Via Bologna, 148
10145 Torino

Direttore dei Laboratori
Di Medicina Veterinaria
Istituto Superiore di Sanità
V.le Regina Elena, 299
00161 Roma

C.O.V.E.P.I.

Centro Operativo Veterinario
Di Epidemiologia,
Programmazione
Ed informazione
Campo Boario
64100 Teramo
Loro Sedi

Oggetto: comunicazione esito "positivo" per _____

In riferimento al/ai campione/i di tronco encefalico di n. _____ inviati presso questo Sede dal _____ -via _____- in data _____ e registrati con i seguenti ns. numeri di registrazione codice identificativo _____, età _____ mesi, sesso _____, razza _____ si comunica l'esito "positivo" della prova test rapido (_____) per diagnosi di _____, eseguita presso il Laboratorio TSE IZSLT della Sede di Firenze e terminata in data _____.

Il prelievo è stato eseguito da _____ presso _____/Il/I soggetto/i provengono dall'Azienda di proprietà di _____ - Località _____ (codice azienda _____), di competenza territoriale dell'ASL _____.

I campioni vengono inviati per ulteriori accertamenti al Centro di Referenza per le Encefalopatie Animali c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino unitamente a copia della documentazione in possesso.

Si resta in attesa dell'esito.

Il Responsabile UOT Toscana Centro
Dr. Giovanni Brajon

Il Responsabile Sicurezza Alimentare
Dr.ssa Paola Marconi

COMUNICAZIONI PER ESITO POSITIVO





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

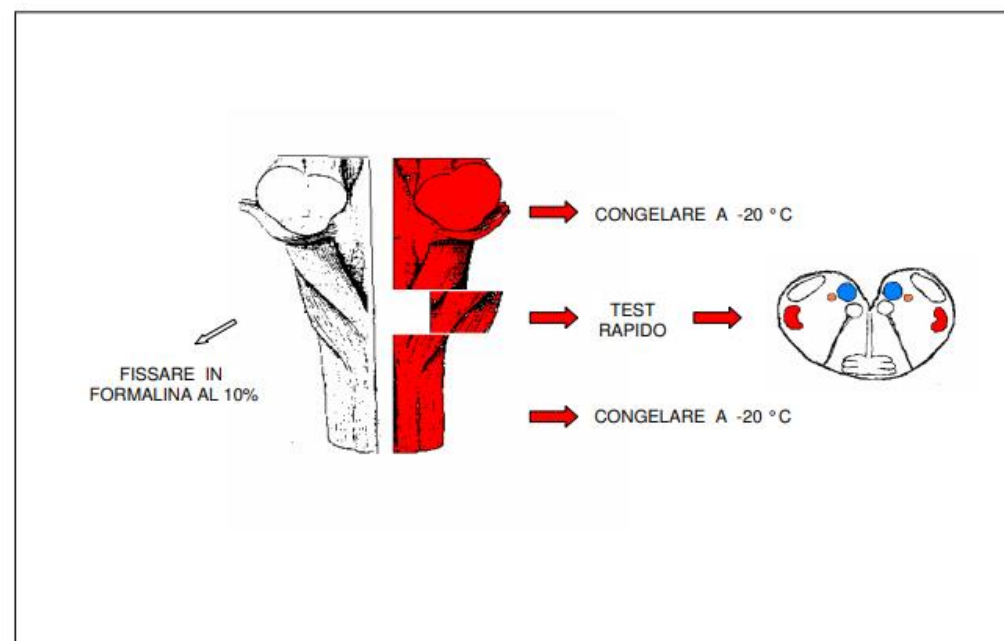
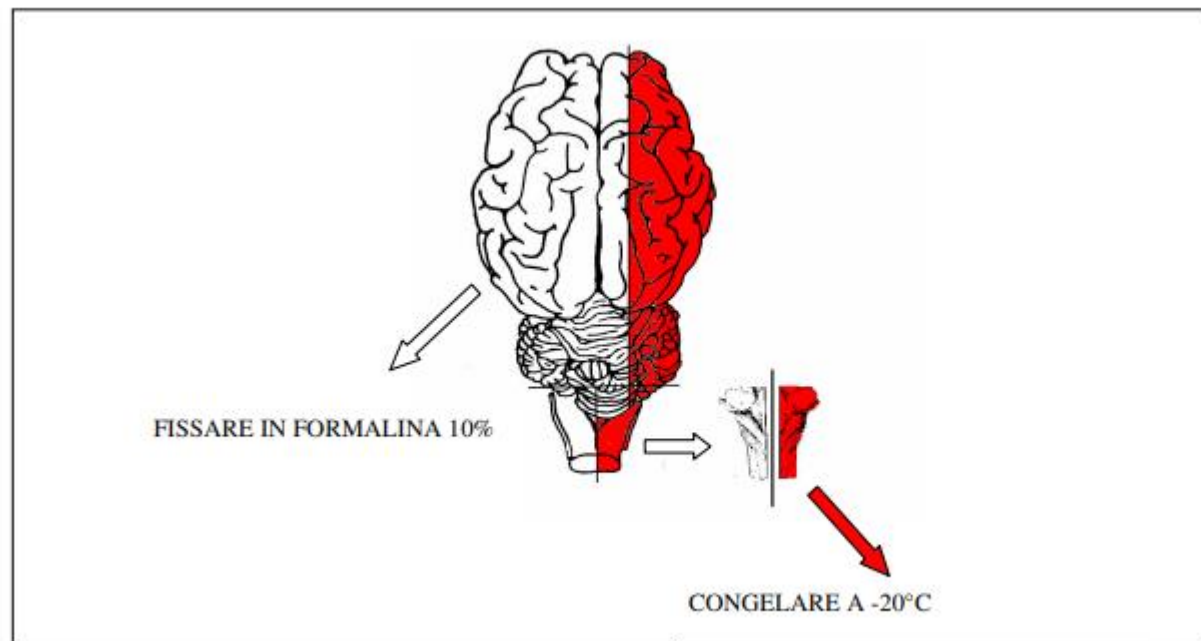


ITER DI CONFERMA

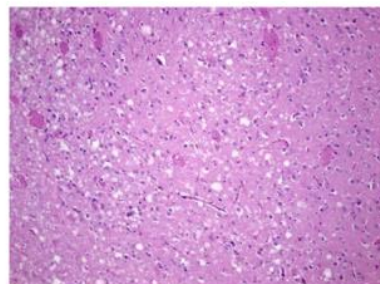


PARTI ANATOMICHE per la CONFERMA CEA

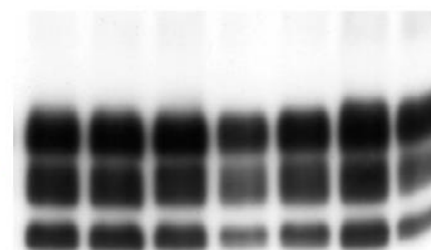
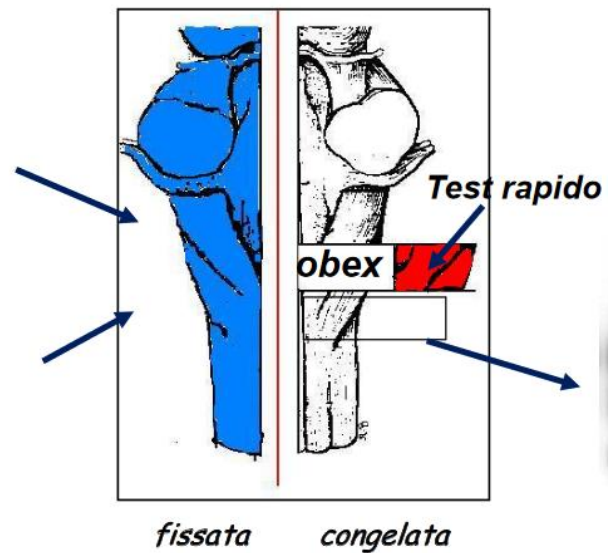
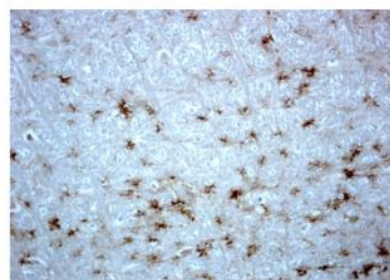
Il laboratorio di I istanza fornisce il materiale per prove di
conferma dell'esito positivo



**Esame
Istologico**

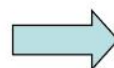


**Metodo
Immunoistochimico**

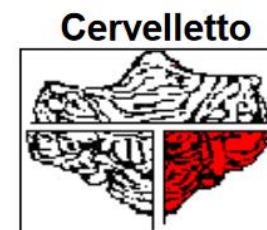


**Western
Blot**

casi atipici



fissata



congelata





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CONFERME CEA

accerta 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)

INVIO CAMPIONI 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-P16/11/2011.

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 per conferma casi sospetti di BSE o di Scrapie

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

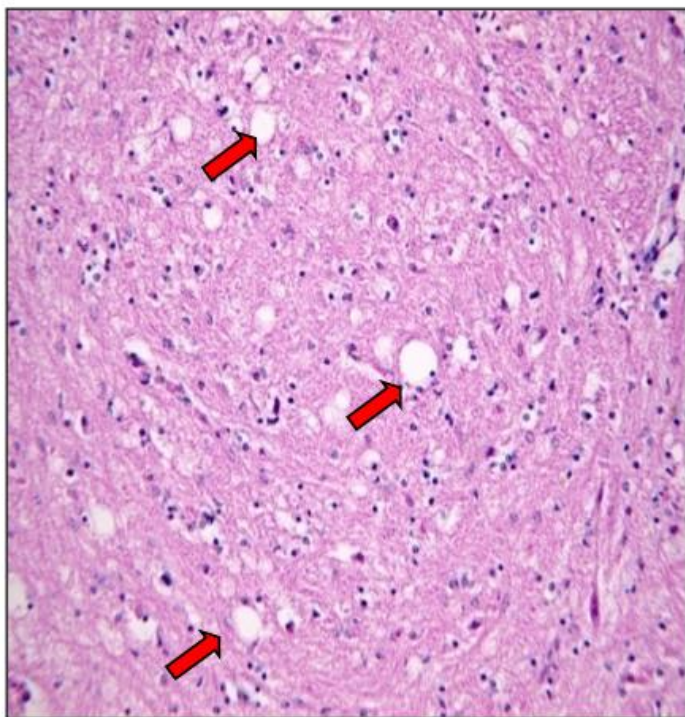
Giudizio diagnostico conclusivo

- esito certo di almeno uno dei tre test di conferma
- esplicitato dal CEA nella lettera di comunicazione ufficiale degli esiti in accompagnamento ai rapporti di prova.

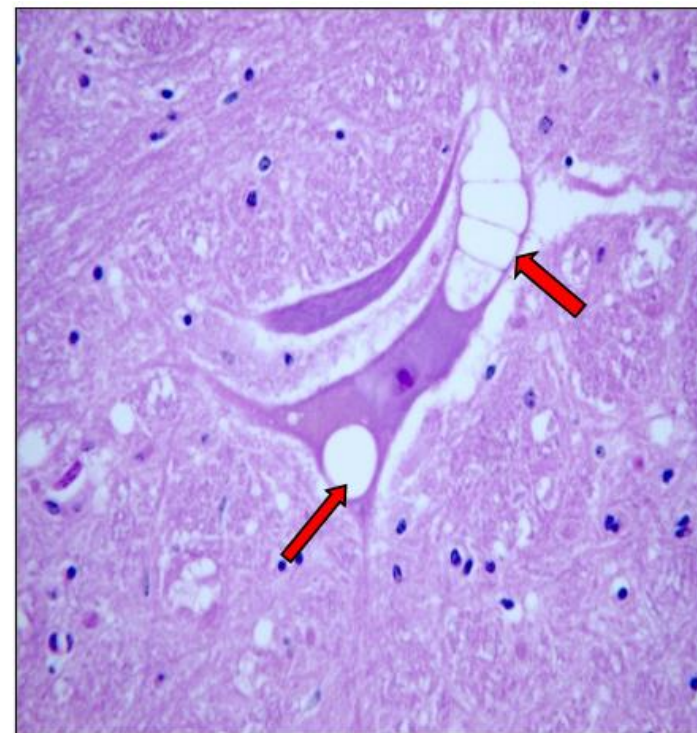


Esame istologico Campione positivo

BSE

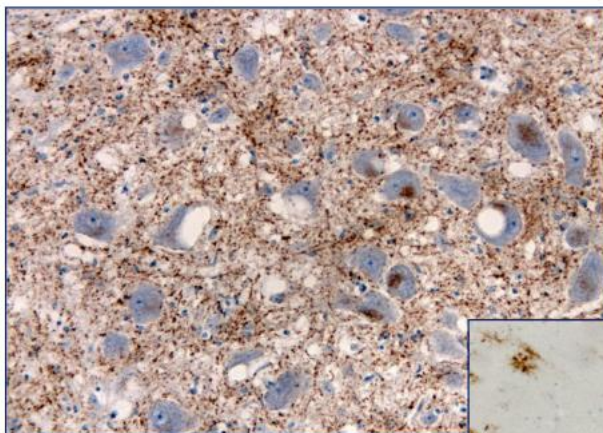


Scrapie

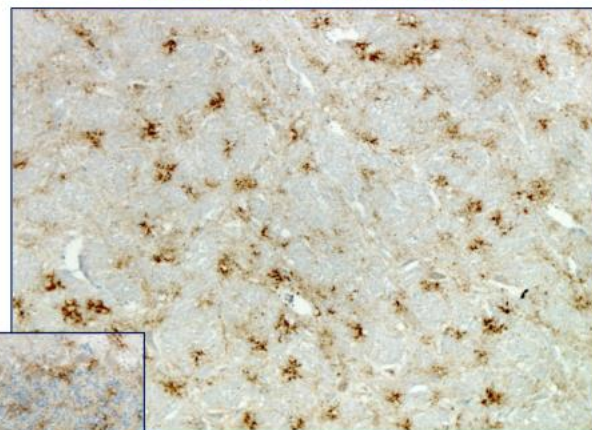


ESAME IMMUNOISTOCHIMICO campione positivo Scrapie

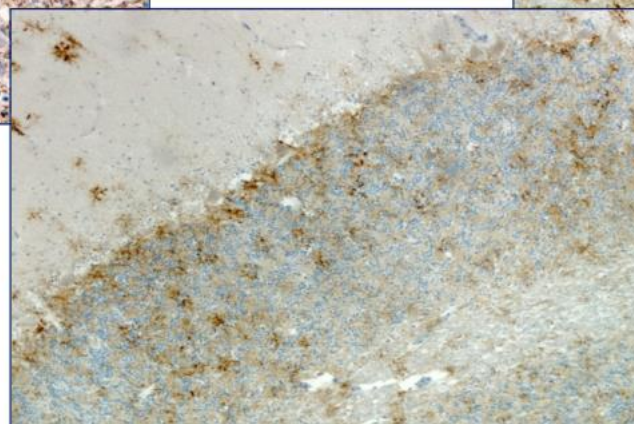
N. MOTORE DORSALE NERVO VAGO



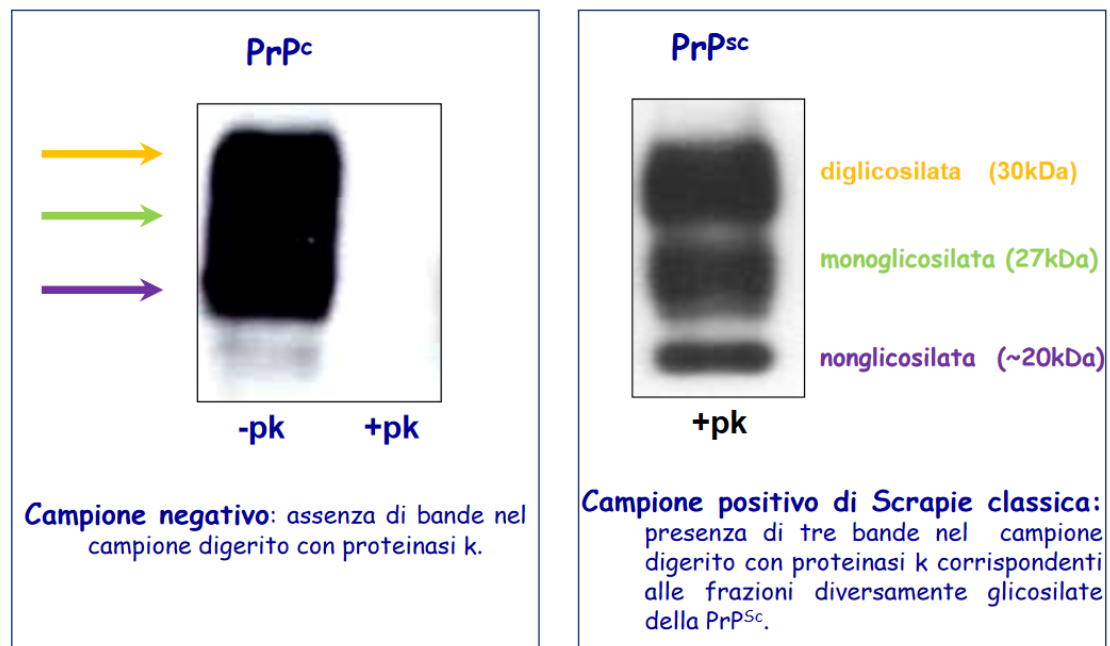
SOSTANZA RETICOLARE



CERVELLETTO

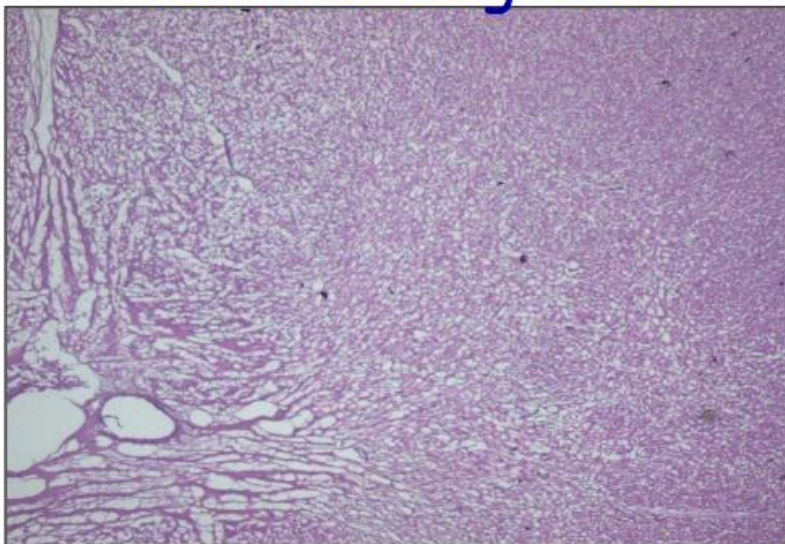


WESTERN BLOT

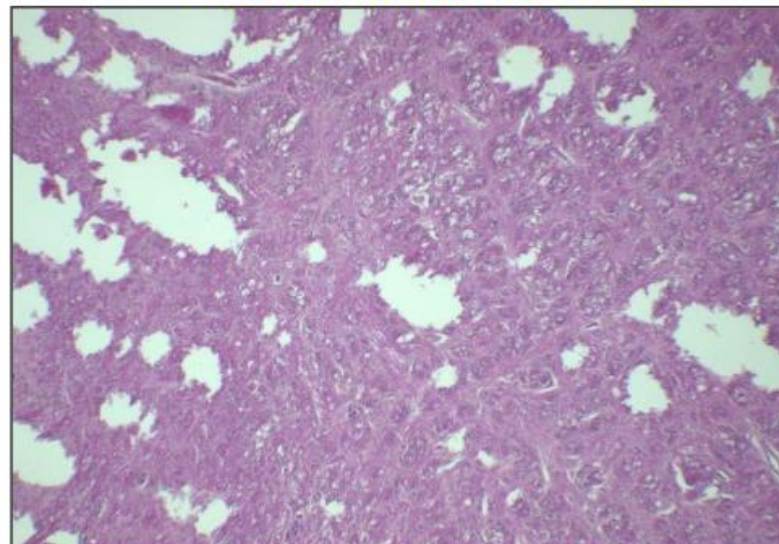


Inadeguata presentazione del campione a causa di una scarsa rappresentazione dei siti target o per la presenza di modificazioni strutturali determinate da un avanzato stato di autolisi o congelamento.

Tessuto congelato



Tessuto autolitico





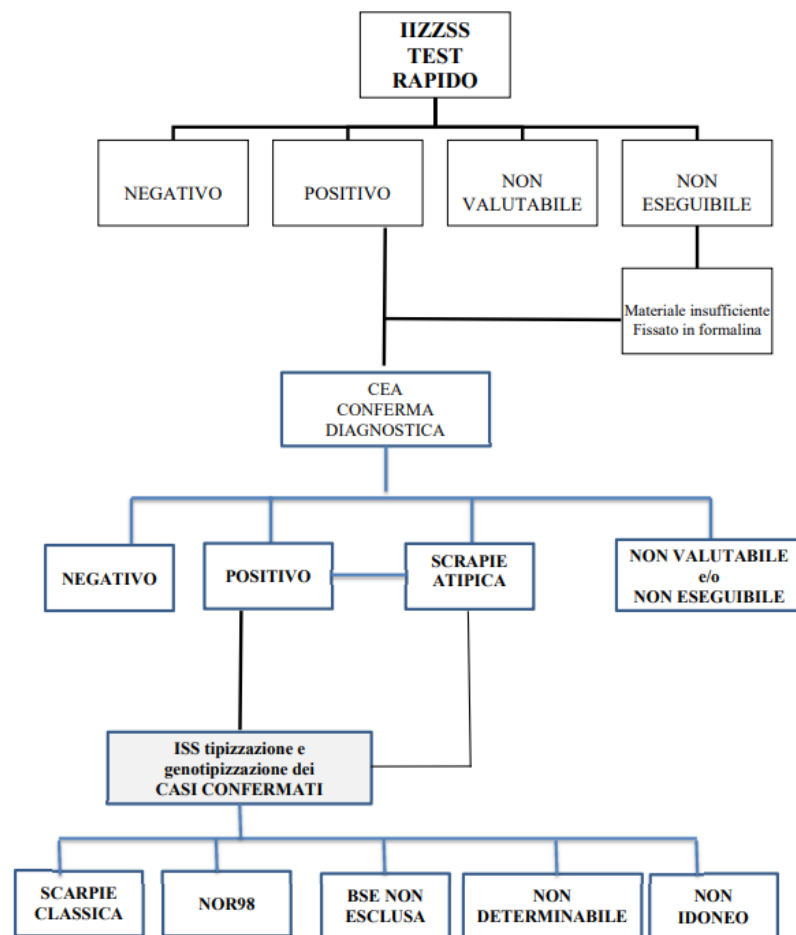
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

BSE NON ESCLUSA

EURL STEG

Gruppo europeo di
esperti per la tipizzazione
dei ceppi

ITER DIAGNOSTICO DELLE EST



DIAGNOSI EST



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
Immunistoichimico (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 scrapie 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

Esiti conferma



CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE PRIMARIA

Identifica le caratteristiche molecolari della PrPSc al fine di escludere la BSE e di, eventualmente, identificare il ceppo di TSE (per es. scrapie classica o atipica del tipo Nor98)

per index vincolante per la gestione dei prodotti (Reg UE 2020/1593)

per casi secondari non comporta alcuna restrizione aggiuntiva, se non quando, da questi, risultasse un esito di “BSE non esclusa”.

GENOTIPIZZAZIONE DEL CASO CONFERMATO

Esame di sequenziamento del gene della PrP, volto ad individuare il genotipo del caso confermato.

Codoni classica 136,154,171 atipica 141 caprini 146, 122





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

CAMPIONE POSITIVO e campione di scrapie atipica: se il risultato di uno dei tre esami di conferma è positivo o di scrapie atipica l'animale deve essere considerato un caso positivo di EST.

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

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" sulla base di quanto comunicato con Nota Ministeriale 13279 del 24/06/2014.





Evidenza di nuove varianti

Classical SCRAPIE

ATYPICAL SCRAPIE

BSE Classica

BSE H

BSE L





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie per l'attenzione

