

## 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, punti 2.1 e 3.1 del reg. (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, punto 2.2 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 ( <a href="http://webupload.izsto.it/upload/">http://webupload.izsto.it/upload/</a> )
Tessuto nervoso proveniente da animale soggetto a sorveglianza attiva	Obex riconoscibile	Effettuare il test rapido	<b>Positivo</b> <b>Negativo</b>	P N
	Obex non identificabile per prelievo non eseguito correttamente	Effettuare il test rapido	In caso di esito negativo, riportare: <b>Non valutabile per obex non identificabile</b>  * 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: <b>Non valutabile per autolisi</b>  * 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: <b>Positivo</b>	P
	Tessuto nervoso assente	<b>NON</b> effettuare il test rapido ma produrre il RdP	<b>Non eseguibile</b>  * 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)	<b>NON</b> effettuare il test rapido ma inviare il campione al CEA	<b>Non eseguibile</b>  *Materiale insufficiente	
	Completamente fissato in formalina	<b>NON</b> effettuare il test rapido ma inviare il campione al CEA	<b>Non eseguibile</b>  *Fissato in formalina	
	Non pervenuto in laboratorio	<b>NON</b> effettuare il test rapido ma produrre il RdP	<b>Non eseguibile</b>  *Campione non pervenuto	
Tessuto nervoso proveniente da animali <b>NON</b> soggetti a sorveglianza attiva	Sotto età diagnostica	<b>NON</b> effettuare il test rapido	<b>Non eseguibile</b>  * Fuori dal campo di applicazione del piano di campionamento (sotto età diagnostica)	
	Altro	<b>NON</b> effettuare il test rapido	<b>Non eseguibile</b>  * 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)	<b>Positivo</b>	Presenza di vacuolizzazione neuronale e/o spongiosi del neuropilo
	<b>Negativo</b>	Assenza di vacuolizzazione neuronale e/o spongiosi del neuropilo
	<b>Non valutabile</b>	Scarsa rappresentazione dei siti target / autolisi / congelamento
	<b>Non conclusivo</b>	Insufficiente vacuolizzazione del neuropilo
Immunoistochimico (campione in formalina)	<b>Positivo</b>	Presenza depositi di proteina prionica patologica (PrP <sup>Sc</sup> )
	<b>Negativo</b>	Assenza di depositi di PrP <sup>Sc</sup>
	<b>Non valutabile</b>	Scarsa rappresentazione dei siti target / autolisi / congelamento
	<b>Scrapie atipica</b>	Presenza di depositi di proteina prionica patologica (PrP <sup>Sc</sup> ) con pattern diverso dalla scrapie classica
Western Blot (campione congelato)	<b>Positivo</b>	Presenza di tre bande di PrP <sup>Sc</sup> (30-20 kDa)
	<b>Scrapie atipica</b>	Presenza di bande di PrP <sup>Sc</sup> (30-12kDa)
	<b>Negativo</b>	Assenza di PrP <sup>Sc</sup> a livello di obex
	<b>Non valutabile</b>	Assenza di obex /obex non riconoscibile
	<b>Non eseguibile</b>	Sospetta cross-contaminazione/campione fissato in formalina

### Azioni da intraprendere a fronte di esiti conclusivi delle conferme diagnostiche

**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. 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.

Nel caso di scrapie atipica 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

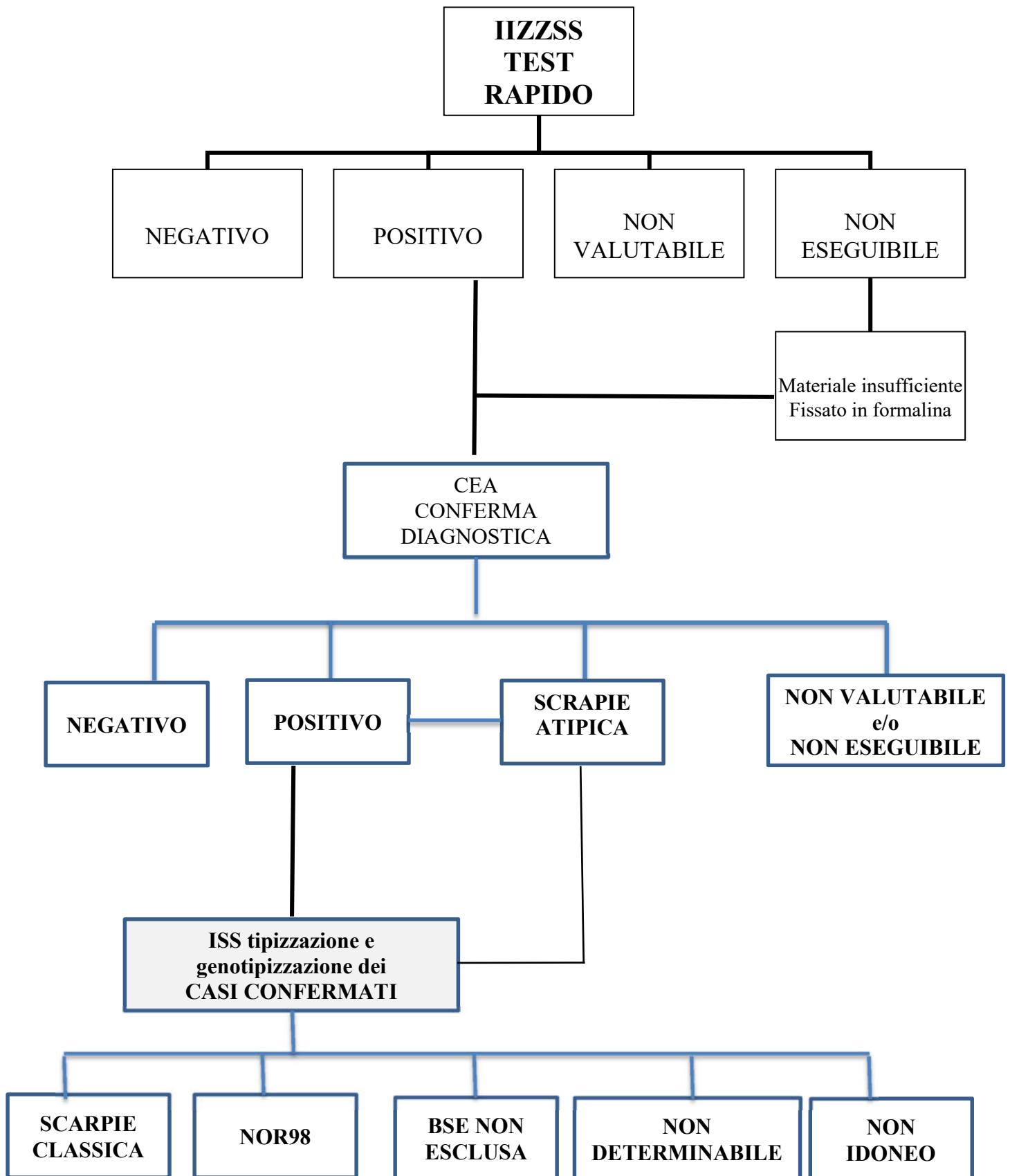
Revoca di tutte le misure  
adottate

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

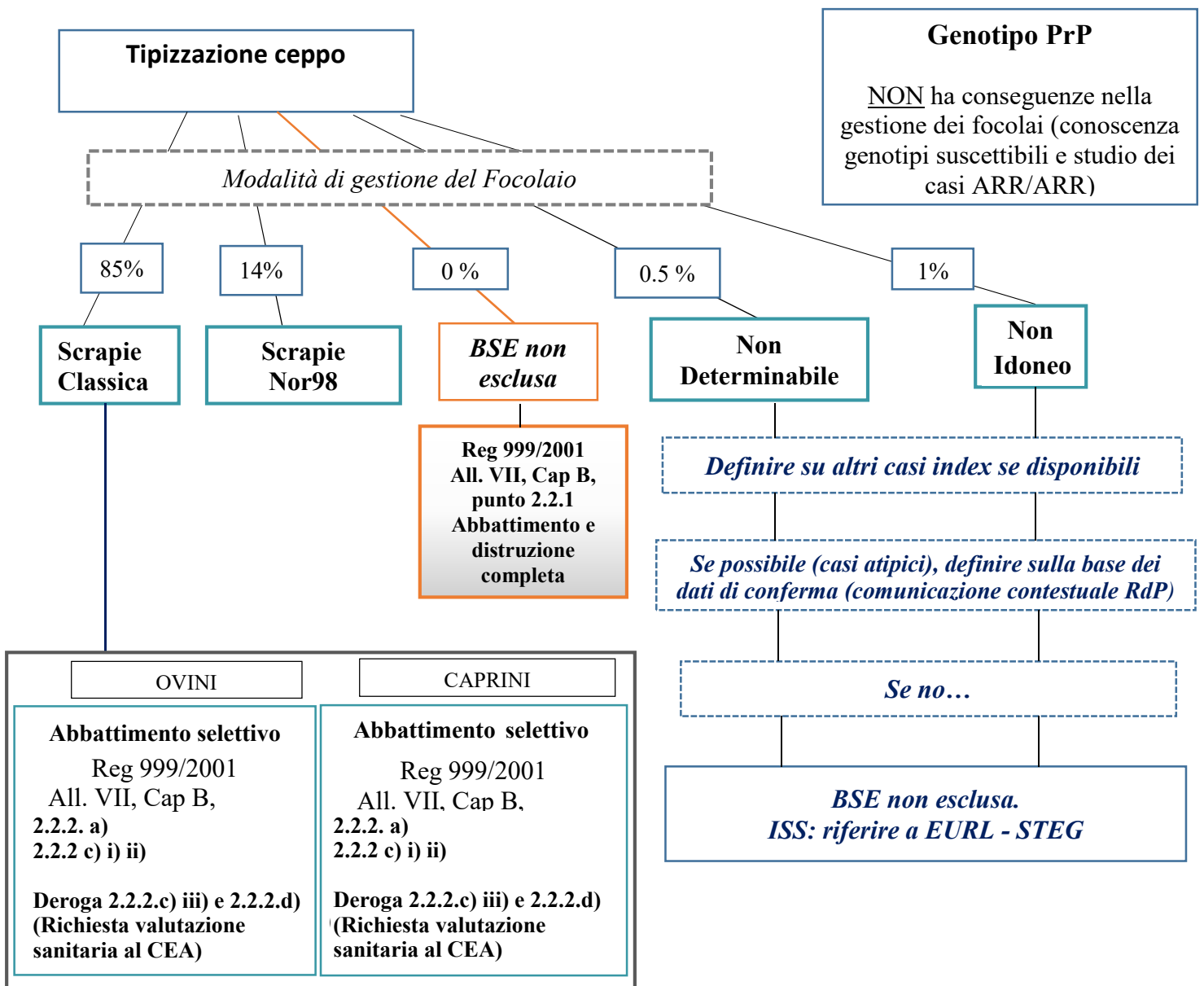
WB: esame western blot; IHC: esame immunocistochemico; HP: esame istologico;  
NC: esito non conclusivo; NV: campione non valutabile; NE: non eseguibile



# ITER DIAGNOSTICO DELLE EST



Campioni confermati positivi  
ISS



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