



CORSO DI FORMAZIONE

“Aggiornamenti: EST e uso dei sistemi informativi nazionali veterinari. Svolgimento delle indagini epidemiologiche”

DIAGNOSI DELLE EST: AGGIORNAMENTI E PROBLEMATICHE

Barbara Iulini

Teramo, 5 ottobre 2016

**-Aggiornamento su di BSE e
scrapie**

**-Problematiche campioni e
interpretazione dei risultati**

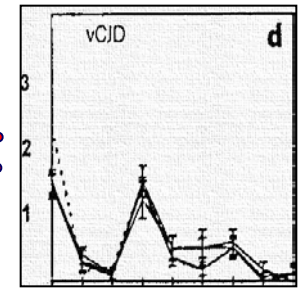
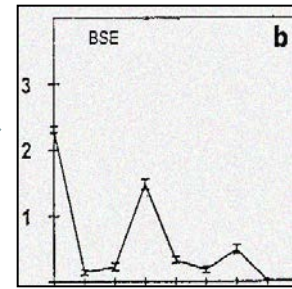
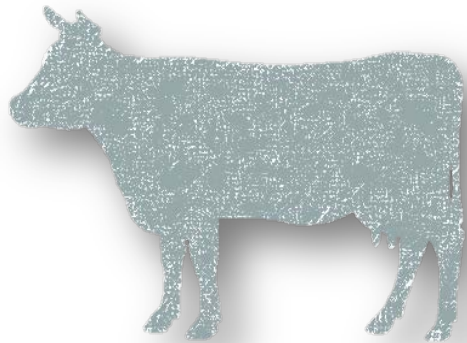


1986: da un'isola al resto del mondo

110.000.000 animali testati in Europa
184.627 casi di BSE in UK
5.543 casi di BSE in Europa
60 casi di BSE nel resto del mondo
(Brasile, Canada, Israele, Giappone)

145 casi in Italia

Classica BSE



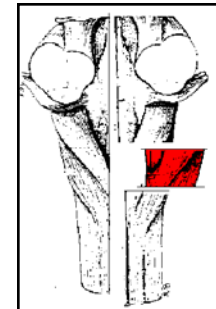
==

BSE

vCJD



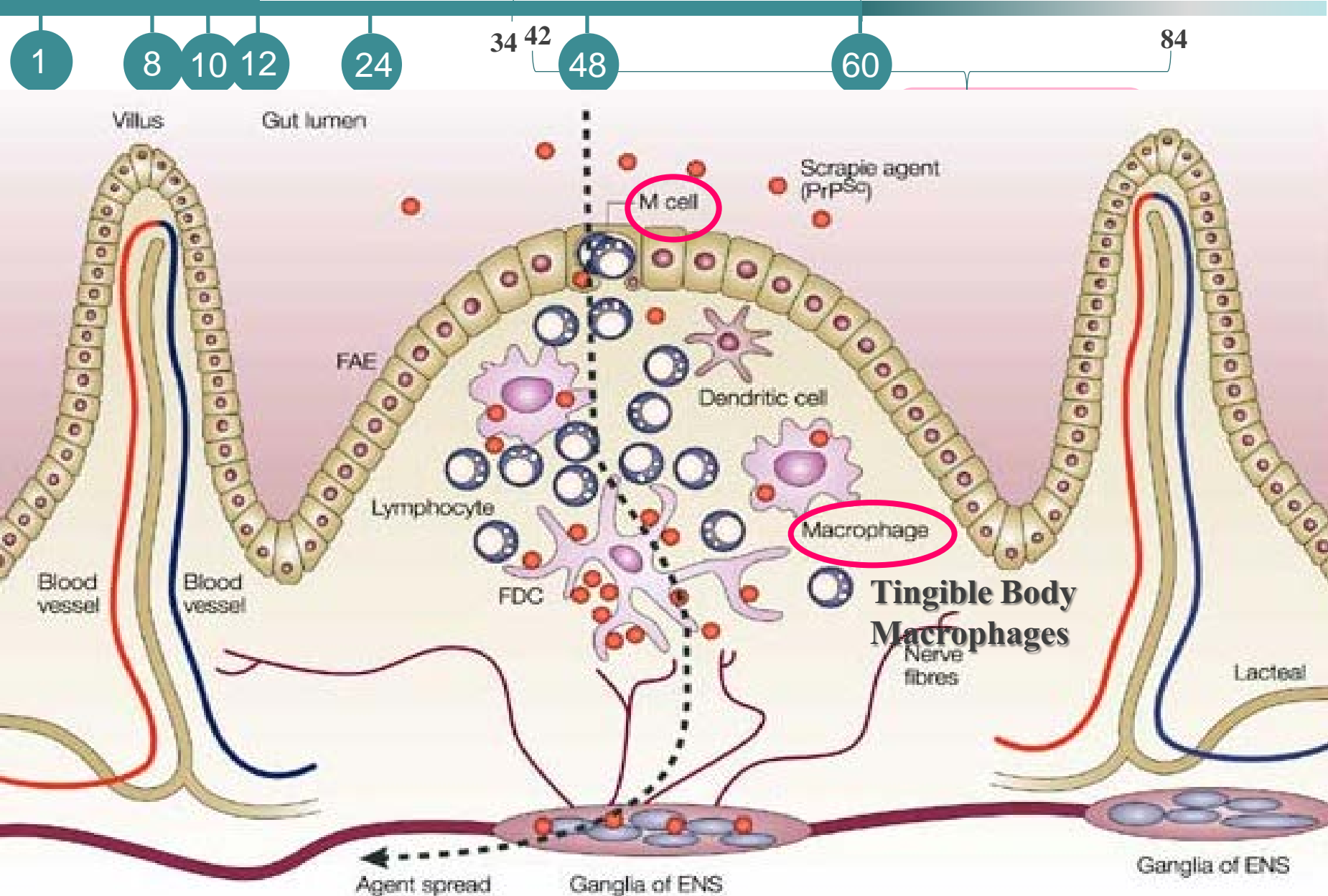
BSE



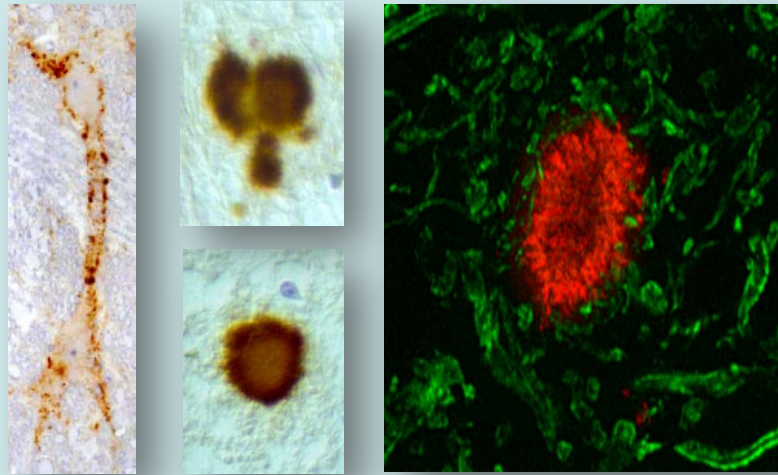
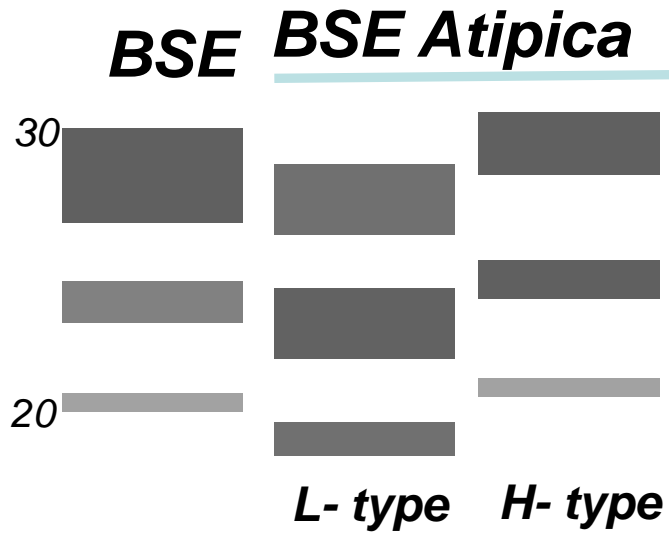
C-BSE: PrPSc progression


m.p.i.

Clinical Onset

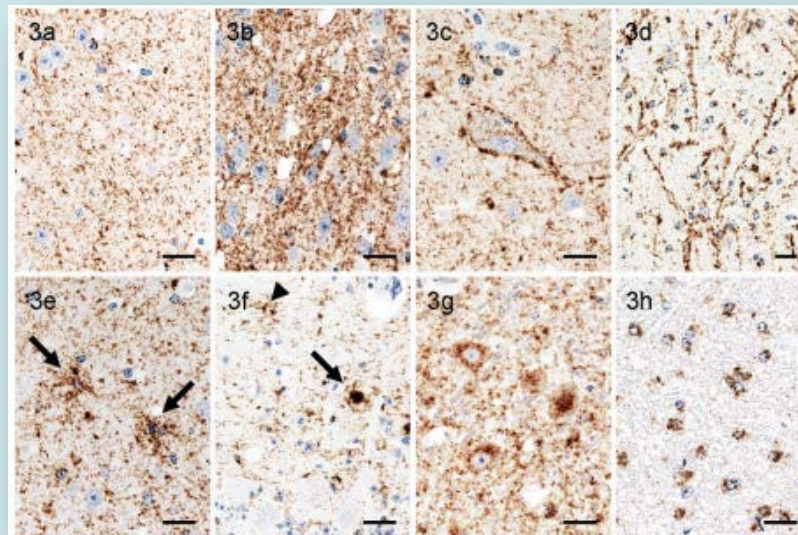


Dal 2004: casi atipici di BSE



L-type

BASE

Natural L-type
 Casalone et al.
 2004
Exp. L-type
 Lombardi
 et al. 2008



H-type

Exp. H-type
 Okada et al. 2011

SINTOMATOLOGIA CLINICA

L ed H - TYPE :

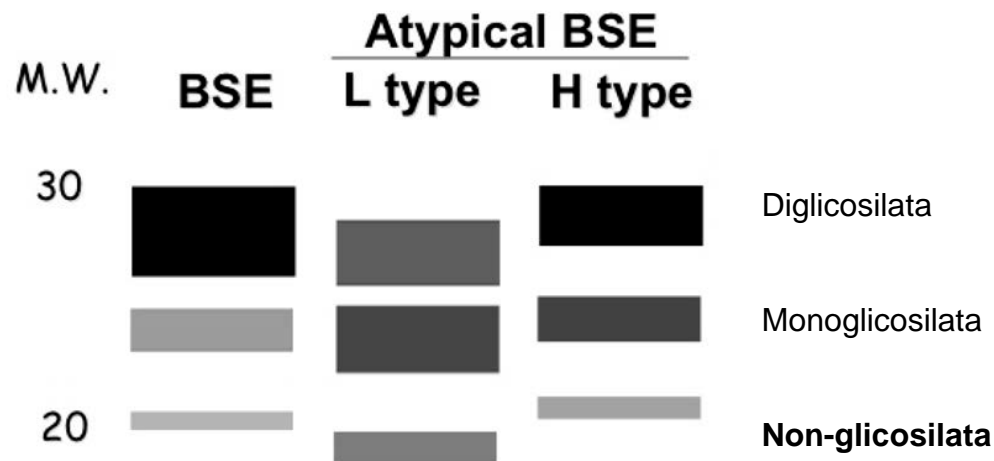


- ✓ Torpore
- ✓ Inattività
- ✓ Portamento basso della testa
- ✓ Perdita di peso
- ✓ Atassia
- ✓ Mioclono
- ✓ Incapacità ad alzarsi
- ✓ **Nessun segno di ipereattività agli stimoli**
- ✓ **Nessun segno di aggressività**

Perché BSE ...ATIPICHE?

Rispetto alla C- BSE

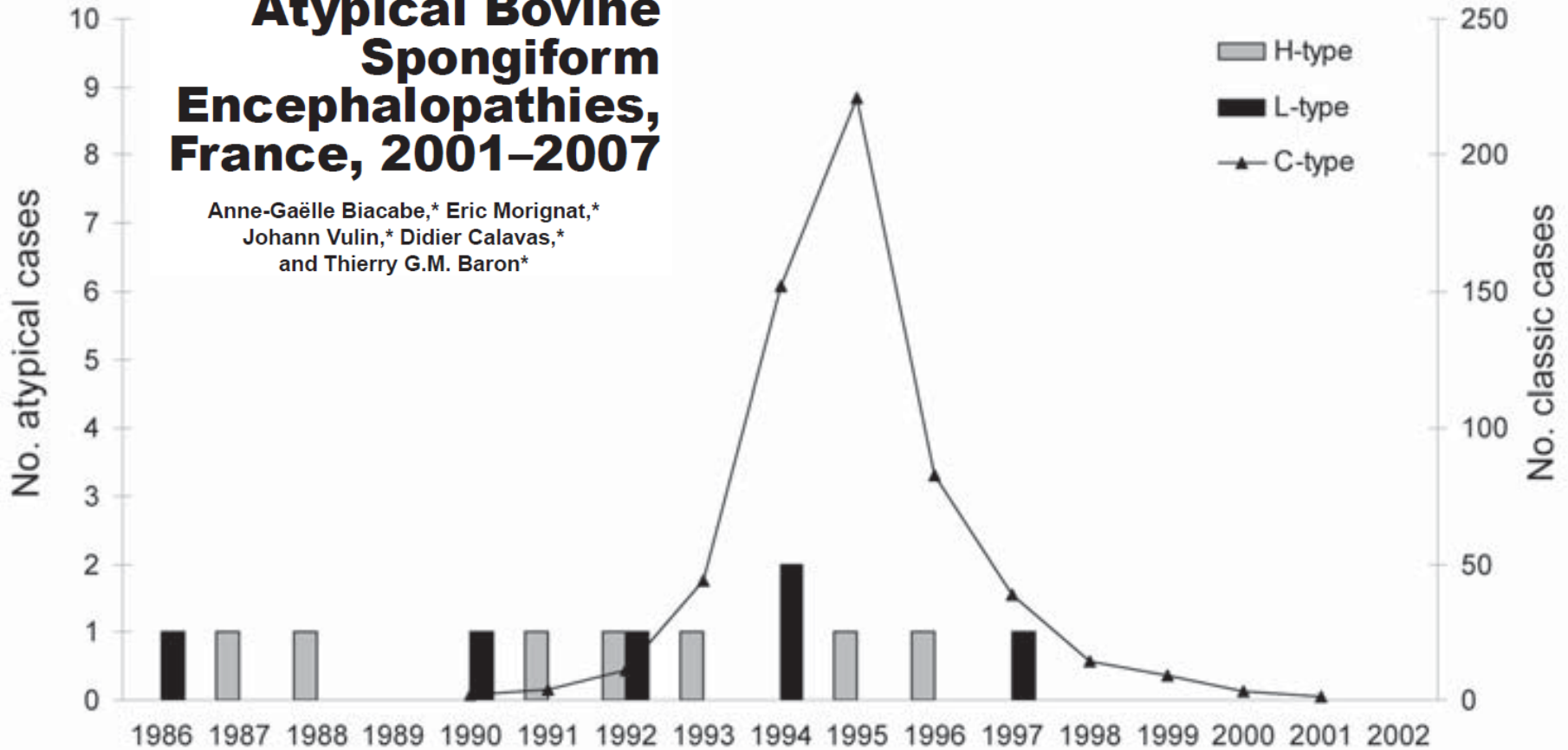
- Diversa età all'esordio
- Diverso periodo d'incubazione
- Diversa sintomatologia clinica
- Diversa distribuzione spaziale delle lesioni istopatologiche
- Diverso profilo immunobiochimico




Nessun legame con la BSE?

Atypical Bovine Spongiform Encephalopathies, France, 2001-2007

Anne-Gaëlle Biacabe,* Eric Morignat,*
 Johann Vulin,* Didier Calavas,*
 and Thierry G.M. Baron*

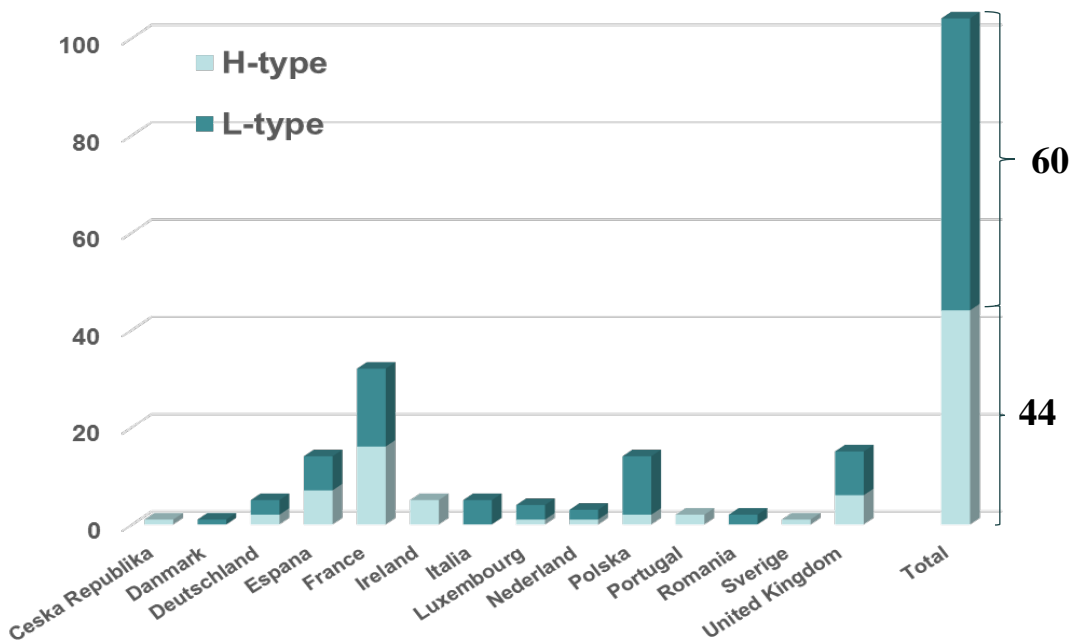


VARIE IPOTESI SULL'ORIGINE DELLE BSE ATIPICHE:



- Infezione dei bovini con un agente eziologico diverso dal prione
 - Infezione prionica da una sorgente non-bovina o con forme non riconosciute di agenti TSE
 - Mutazioni genetiche nel gene PRNP
 - Forme spontanee o sporadiche di TSE nei bovini, limitate all'età avanzata, come per esempio la sCJD nell'uomo
- 

BSE Atipica : Sorveglianza

In Europa
...dal 2001



Nel resto del mondo da 1989

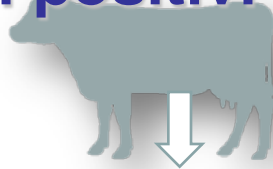
Countries	Atypical cases
	1
	3

Dati incompleti dal sito OIE

Casi diagnosticati durante la
sorveglianza attiva

Tessuti positivi in comune

L-type



H-type

Cervello e midollo spinale

Nervi

Nervo mediano	Nervo frenico
Nervo accessorio	Nervo radiale
Nervo ottico	Nervo sciatico
Nervo soprascapolare	Nervo vago
Nervo tibiale	Tronco vagosimpatico

Nervi

Nervo facciale
Nervo ipoglosso

Gangli e plessi

Ganglio mesenterico craniale
Ganglio cervicale mediano

Ganglio stellato
Plesso brachiale
Ganglio trigemino

Gangli e plessi

Ganglio celiaco mesenterico
Ganglio cervicale craniale
Gangli delle radici dorsali

Muscoli

Bicipite	Pettorali
Lunghissimo	Peroneo
Dorsale	Semitendinoso
Gluteo medio	Trapezio

Extraoculare
Tricipite

Muscoli

Atri tessuti

Surrenali

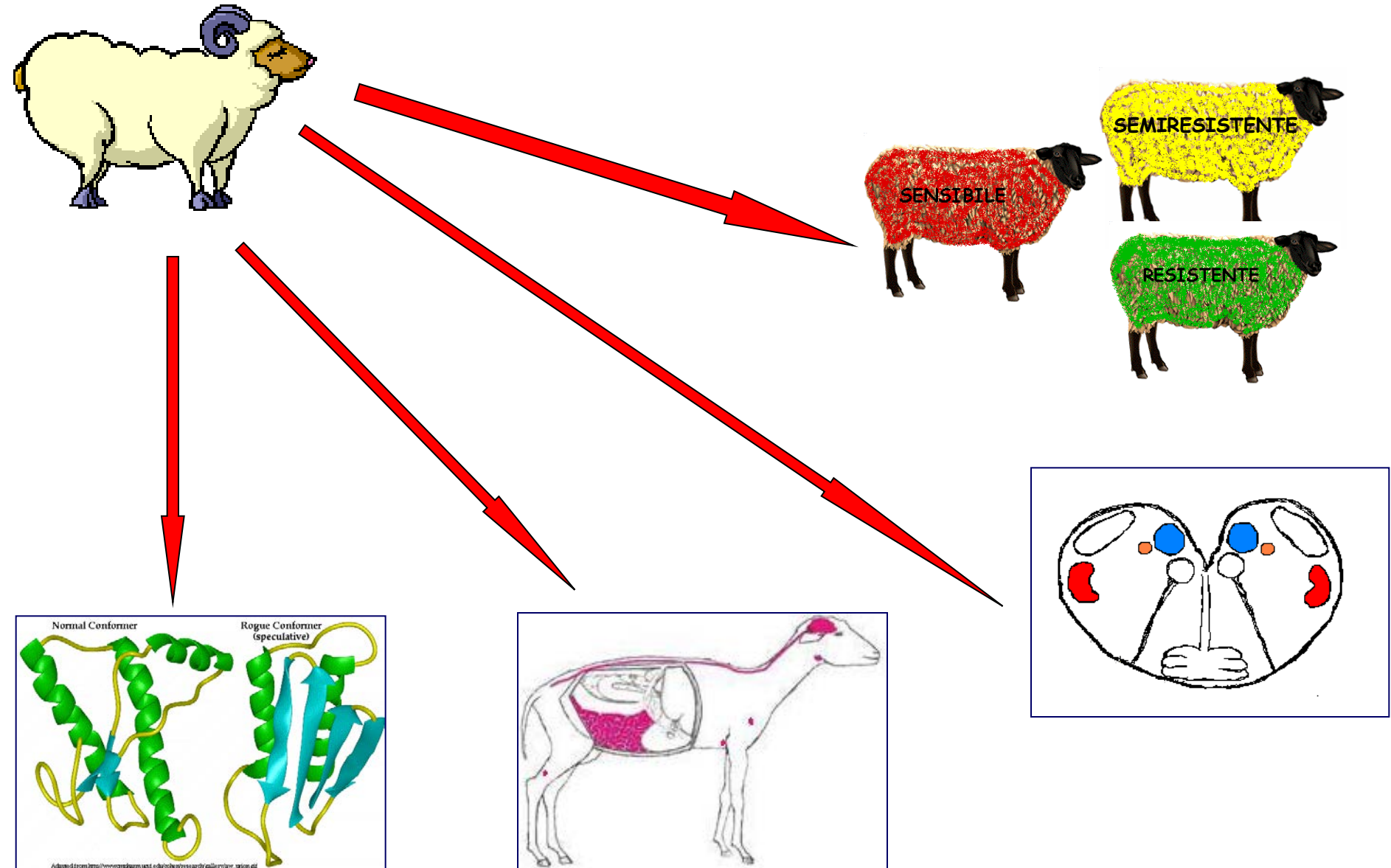
Atri tessuti

Retina

MOLTE QUESTIONI RESTANO IRRISOLTE

Question	Classical BSE	Atypical BSE
Origine?	Sconosciuta	Spontanea?
Diffusione ?	Via alimentare	Sconosciuta
Segni clinici?	Ben conosciuti	Limitati a dati sperimentali
Patogenesi?	Modelli sperimentali	Sconosciuti
Patologia?	Ben descritta	Limitati a dati sperimentali
Distribuzione nei tessuti?	Modelli sperimentali Dati di campo	Dati di campo limitati (solo L) Modelli sperimentali (ic solo)
Ospiti?	Dati sperimentali e di campo	Limitati dati sperimentali
Zoonosi?	Si	Sconosciuto

Scrapie Classica



Scrapie atipica



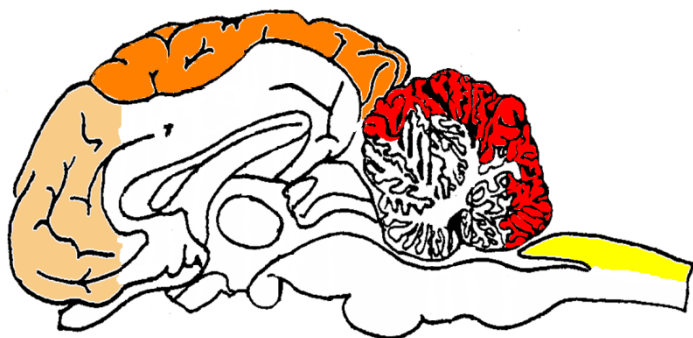
In Italia sono stati identificati 112 casi di scrapie atipica/Nor98 attraverso la sorveglianza attiva dal 2005 ad oggi: 92 casi in pecore e 20 in capre

- Test rapidi: TeSeE Bio-rad e IDEXX Herd Check BSE
- Istologia: assenza di vacuolizzazione nell' obex
- Immunoistochica :Nucleo dorsale del vago negativo; cervelletto positivo
- Western Blot (WB): differente profilo con un banda a 12 kDa band

Distribuzione della PrP^{Sc} nell'intero encefalo

-	-/+	+	++	+++
0	1	2	3	4

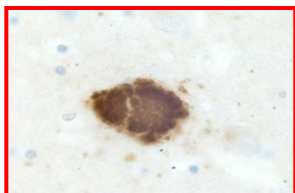
Caso atipico



Caso classico



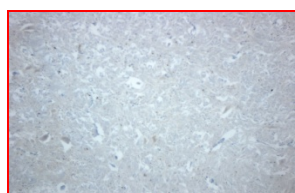
placche



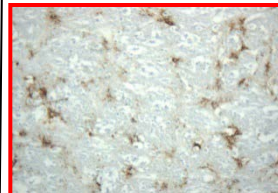
granulare



negativo



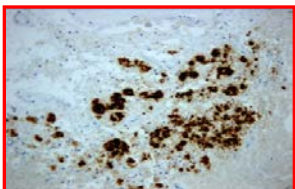
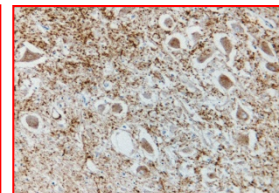
gliall



gliale



puntato/granulare



aggregati

Profilo della PrP^{Sc} nella scrapie classica e atipica

Western Blot analysis showing the different molecular pattern of PrP^{Sc} in classical (C) and atypical/Nor98 (A) scrapie cases



Caso di scrapie "Inusuale" nel 2009

Ovino di razza Bergamasca di 4,5 anni



L'intero encefalo, lingua e linfonodi sottomandibolari di ogni caso positivo sono stati esaminati

IHC con F99/97.6.1
Istologica con Ematossilina Eosina
Western Blot con mAbs P4 (93-99aa) e 4G11 (199-218aa)

Caso di scrapie "Inusuale"

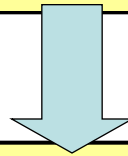
- Immunoistochimica : simultanea presenza di caratteristiche di Nor98 e scrapie classica
- Istologia : pochi vacuoli nel neuropilo a livello dell'obex
- Western Blot : tre bande di scrapie classica e una ~12kDa

- Linfonodi mostravano un pattern della PrP^{Sc} con caratteristiche molecolari simili alla scrapie classica
- Lingua negativa
- Analisi genetica: AL₁₄₁RQ/AF₁₄₁RQ

Caso di scrapie "Inusuale"

Due possibili ipotesi:

- 1. co-esistenza di Nor98 e scrapie classica**
- 2. Presenza di un nuovo fenotipo di scrapie**



La trasmissione sperimentale in arvicole e Tg338 mice, ha confermato la co-esistenza di due differenti ceppi

**-Aggiornamento su di BSE e
scrapie**

**-Problematiche campioni e
interpretazione dei risultati**

SORVEGLIANZA EST OVI-CAPRINE

Sorveglianza attiva

Sorveglianza passiva

Test rapido positivo o dubbio

**Animali con
sintomatologia
neurologica**

**CEA
test di conferma**

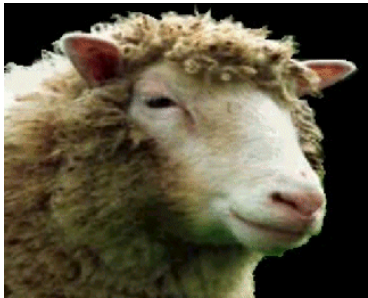
Campione positivo

Campione negativo

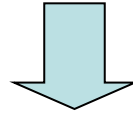
**ISS per caratterizzazione
molecolare e
genotipizzazione**

**Diagnosi differenziale sull'intero
encefalo di animali da
sorveglianza passiva**

SORVEGLIANZA EST OVI-CAPRINE



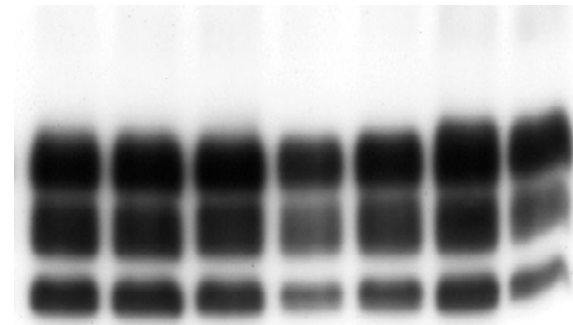
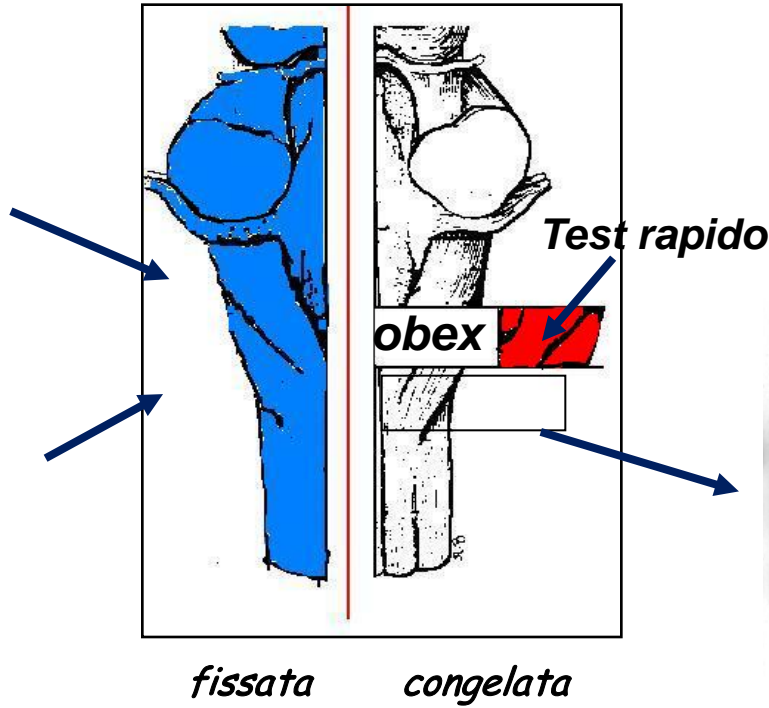
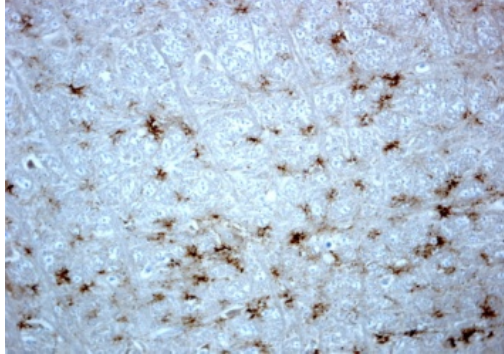
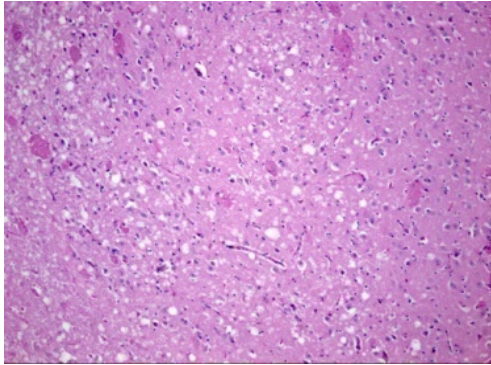
NOTA MINISTERIALE
Prot. DG VA.VIII/22088/P-I.8.d/48 del 15/7/04



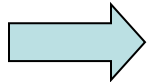
- Tutti i casi di EST ovi-caprina confermati dal CEA nell'ambito della sorveglianza attiva e passiva devono essere inviati all'ISS per l'esecuzione delle prove di genotipizzazione e caratterizzazione dei ceppi
- Recupero dell'intera testa, prelievo dell'encefalo ed invio al CEA

Impossibilità di recuperare l'intera testa
Importante disporre del tronco e del cervelletto

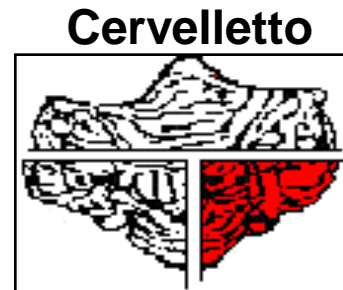
TEST DI CONFERMA



casi atipici

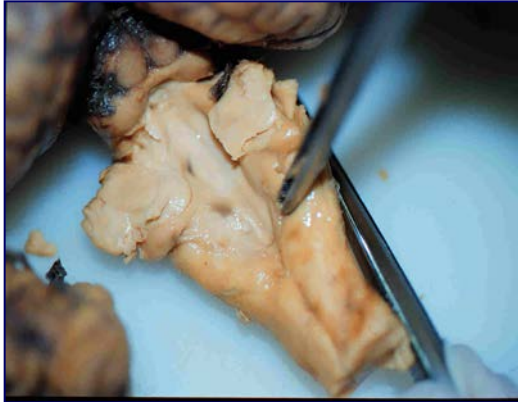


fissata



congelata

TEMPI DI RISPOSTA



7-15 giorni



Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Direttore Generale f.f. dot. ssa Maria Caramelli

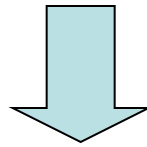


SC NEUROSCIENZE CON ANNESSO CEA - Responsabile di Maria Caramelli
LABORATORIO NEUROPATOLOGIA - Responsabile di Cristina Cassione
Via Bologna 148 10154 Torino (To) Tel.011266861 Fax.0112497770

LAB. N° 0209
Ventre degli animali di
Nuova Circolazione SA, SA e SA

RAPPORTO DI PROVA

Rapporto di Prova N° 122102 Data Generazione 30-09-2014



Tempi tecnici

- Istologico → 5-7 giorni
- Immunoistochimico → 2-3 giorni
- Esame Western Blot → 2-3 giorni



CRITICITA' CAMPIONI



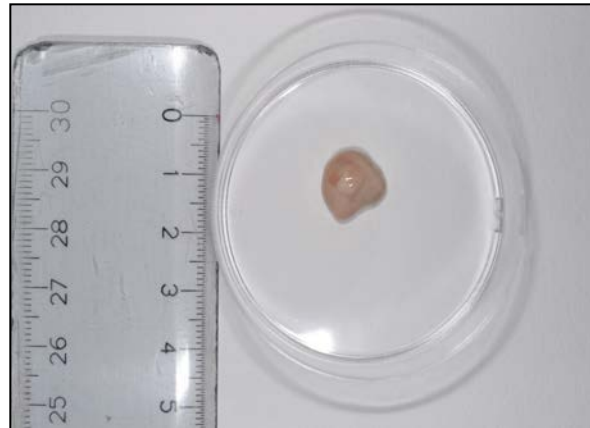
Tessuto frammentato



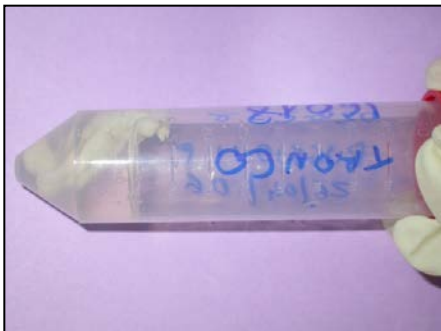
Tessuto autolitico



prelievo non eseguito correttamente
dal veterinario prelevatore



**Tronco encefalico
in scarsa quantità**



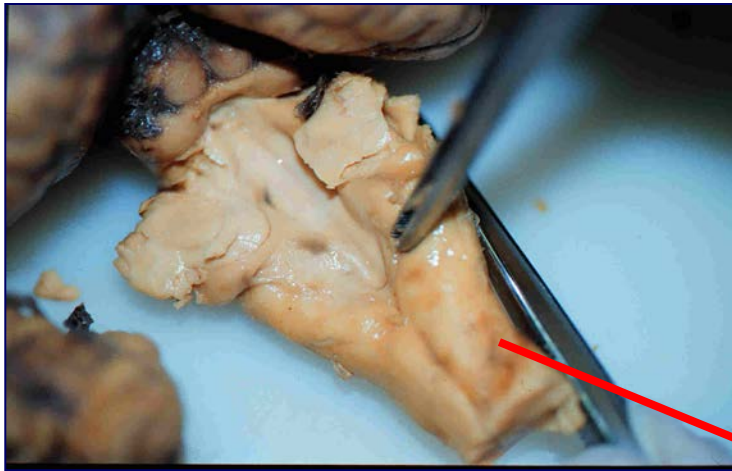
**Tessuto in formalina
congelata**

esecuzione di un secondo
campionamento
per ripetizione test rapido

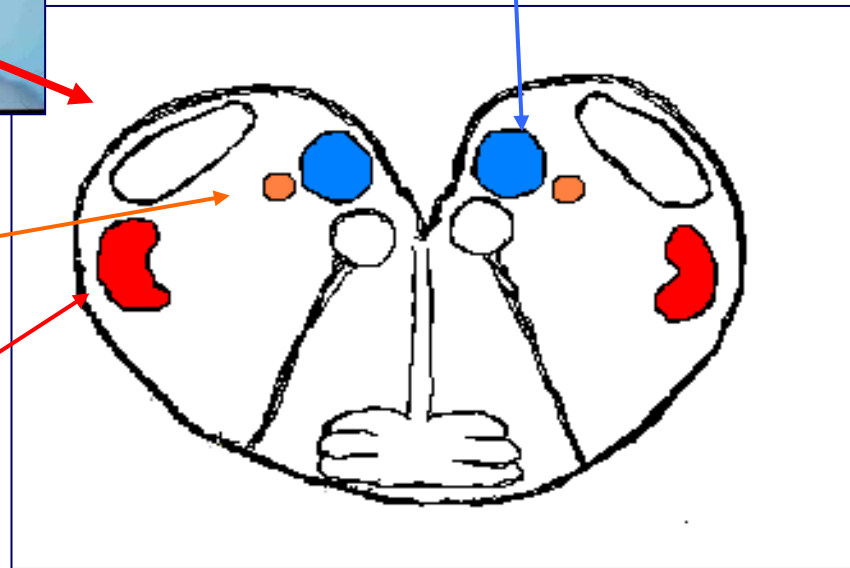
Esiti rapporto di prova esami istologico e IHC

**Parametri stabiliti dal *EU Reference
Laboratory for TSE***

Diagnosi di EST



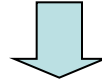
*NUCLEO motore
Dorsale Vago*



NUCLEO tratto solitario

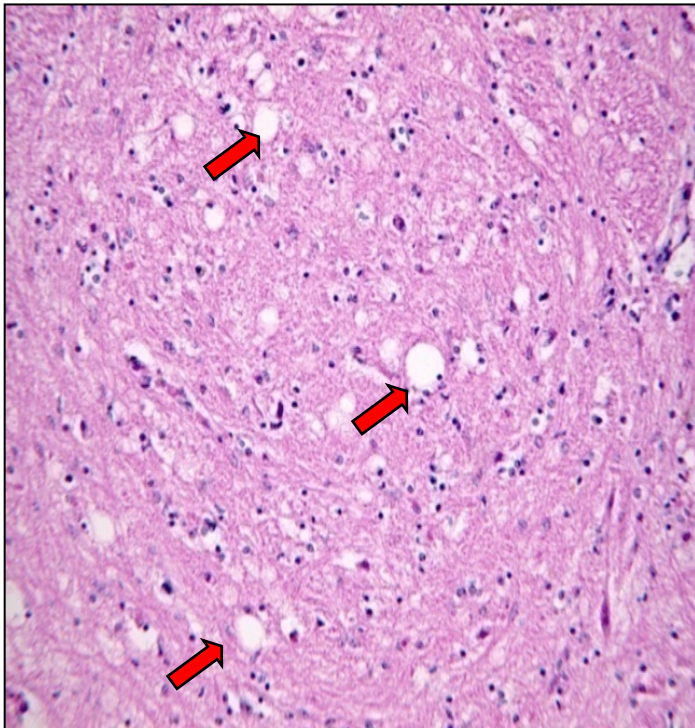
*NUCLEO tratto spinale
trigemino*

ESAME ISTOLOGICO

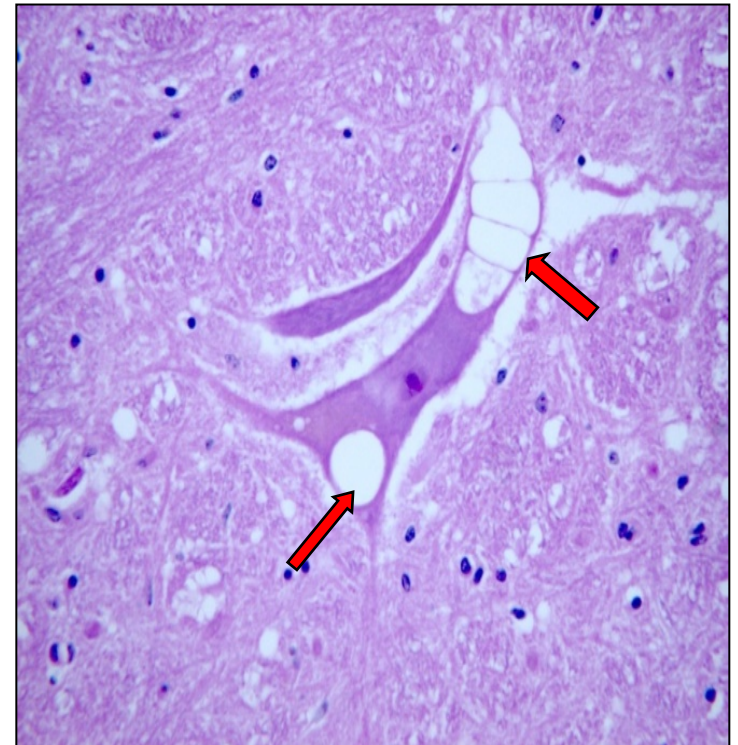


CAMPIONE POSITIVO

BSE



Scrapie



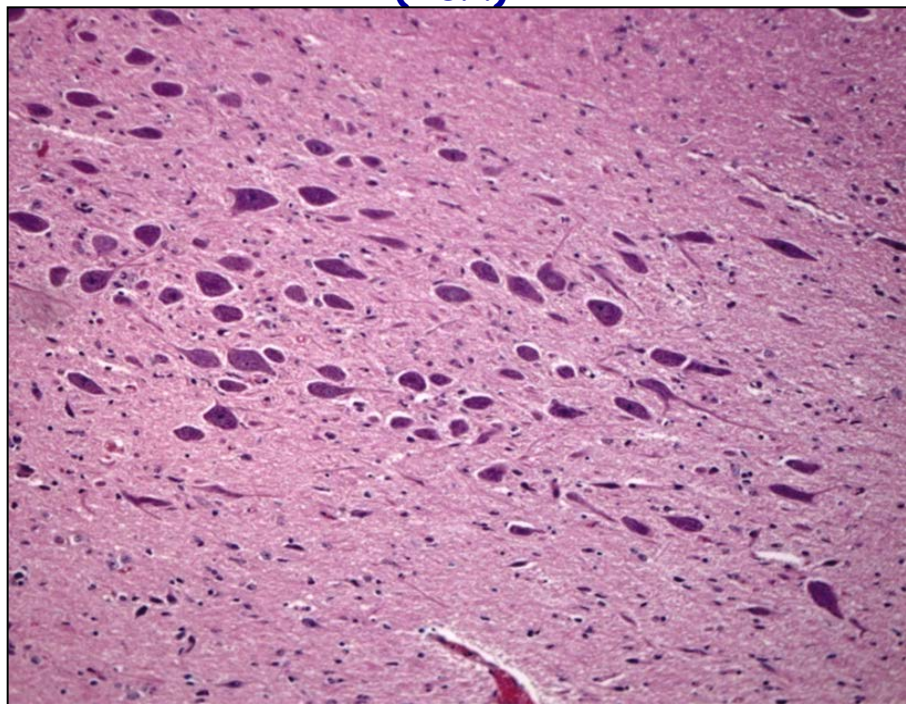
ESAME ISTOLOGICO



CAMPIONE NEGATIVO

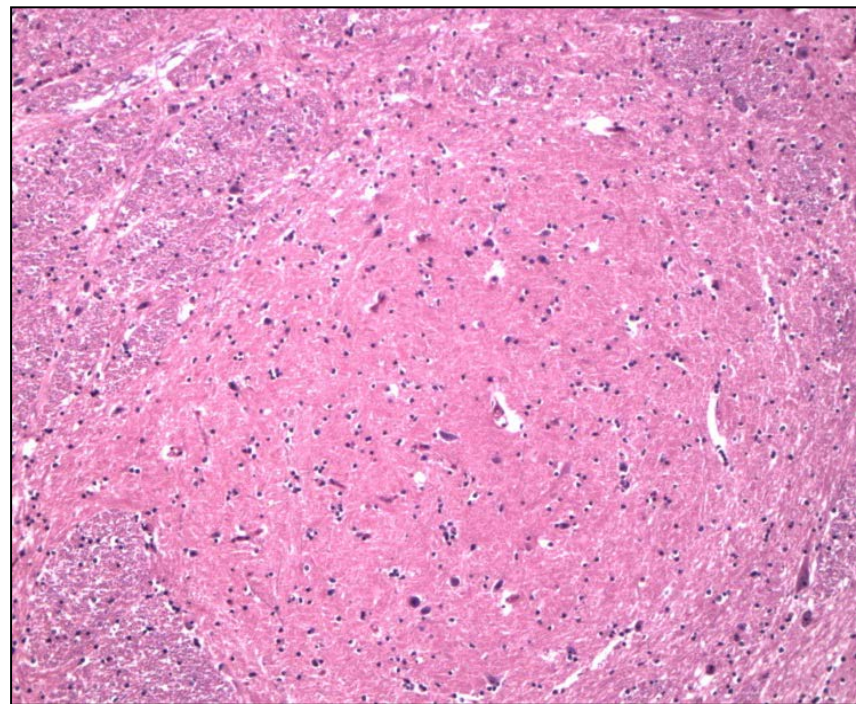
SCRAPIE

N. MOTORE DORSALE NERVO VAGO
(10X)

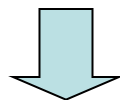


BSE

N. TRATTO SOLITARIO (10X)



ESAME ISTOLOGICO

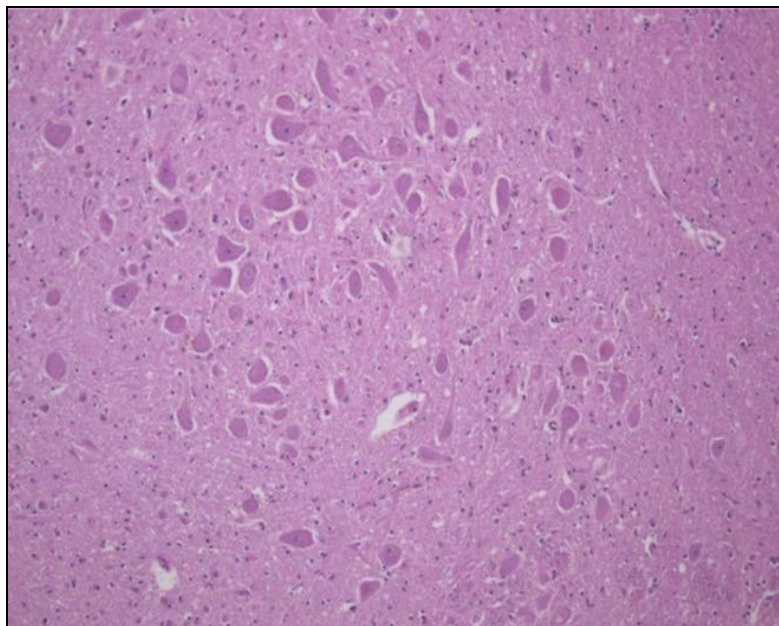


CAMPIONE NON CONCLUSIVO

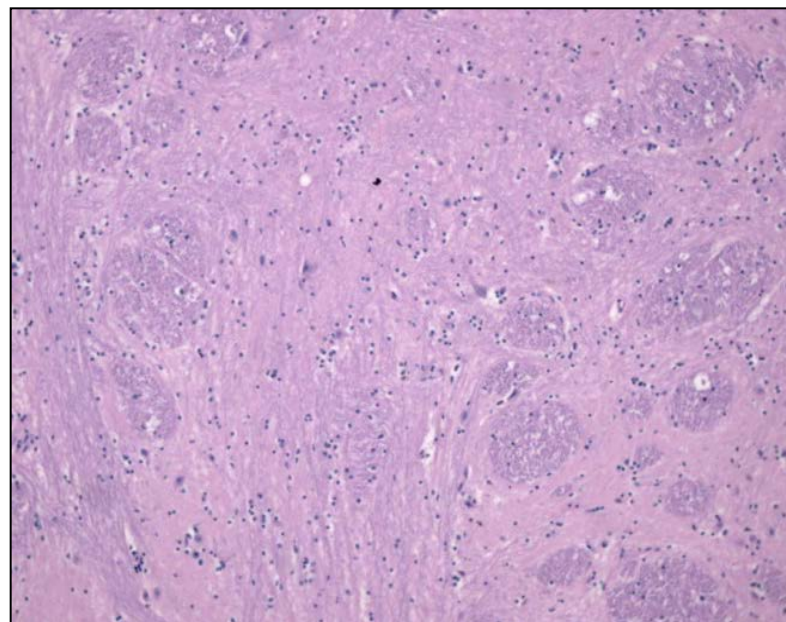
Insufficiente vacuolizzazione del neuropilo tale da non consentire una diagnosi inequivocabile

SCRAPIE

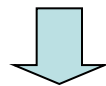
N. MOTORE DORSALE NERVO VAGO



N. TRATTO SPINALE NERVO TRIGEMINO



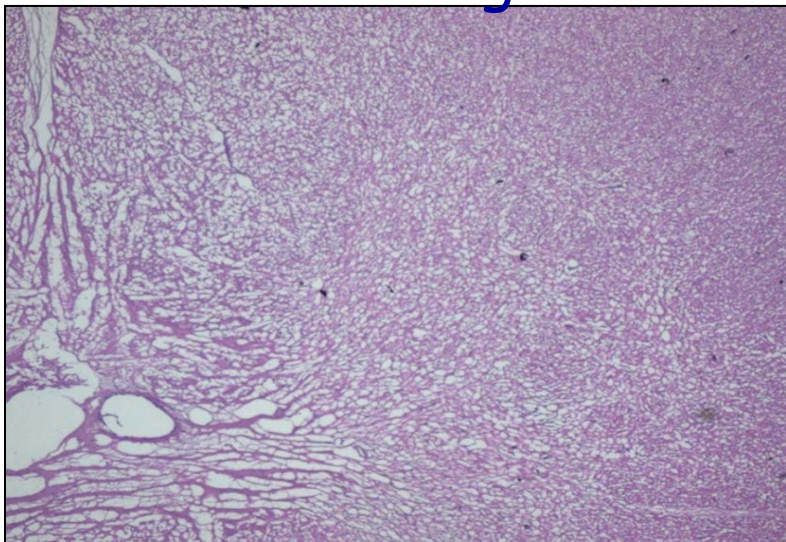
ESAME ISTOLOGICO



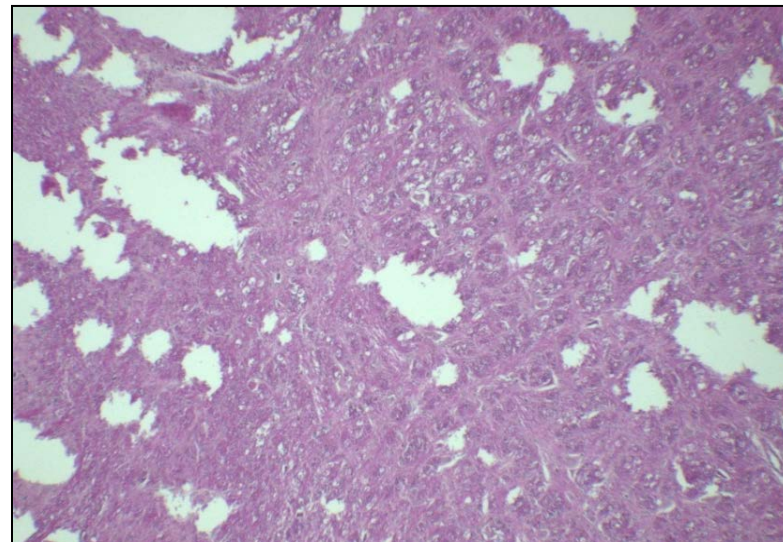
CAMPIONE NON VALUTABILE

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.

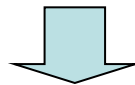
Tessuto congelato



Tessuto autolitico



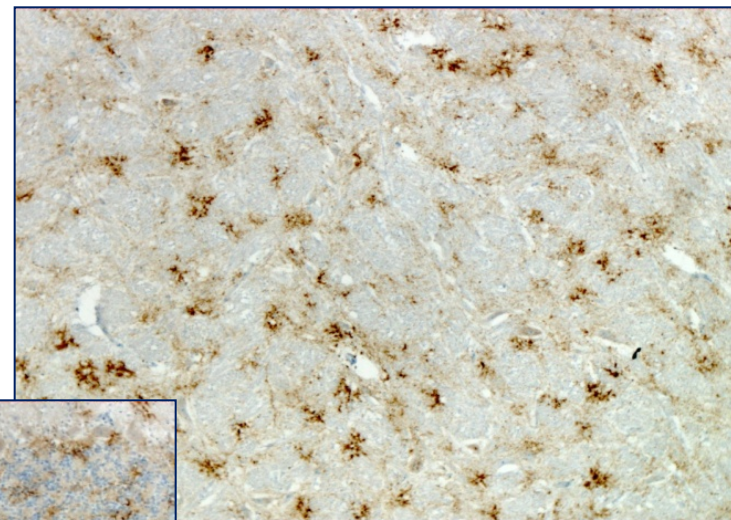
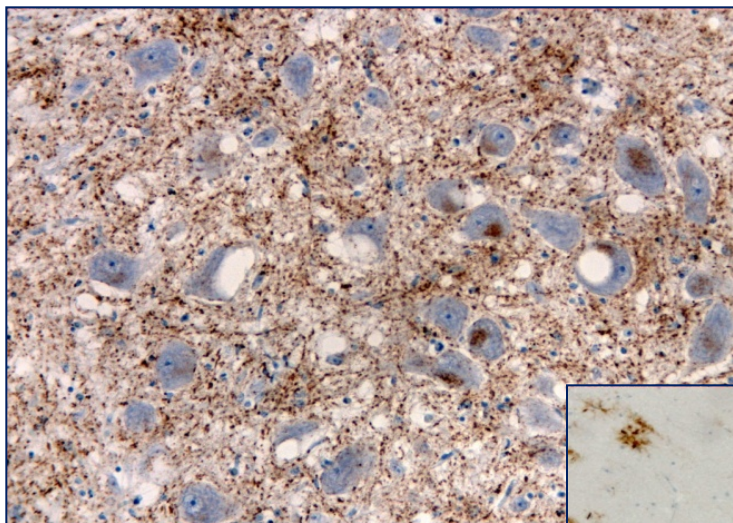
ESAME IMMUNOISTOCHEMICO



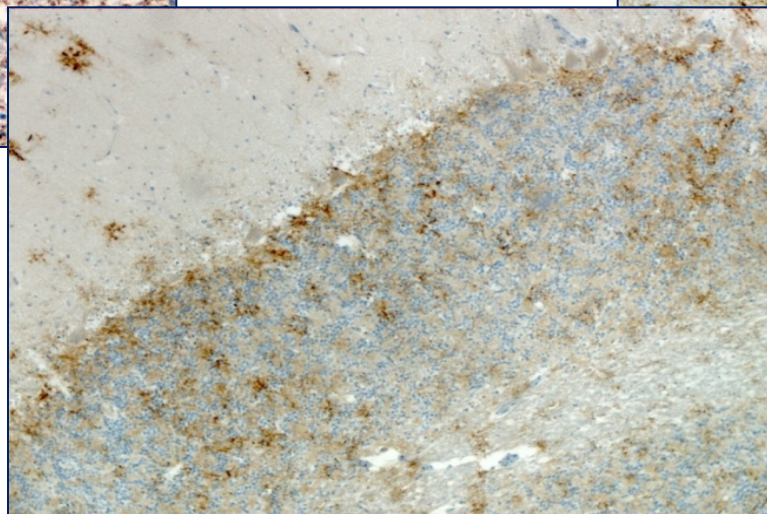
CAMPIONE POSITIVO

N. MOTORE DORSALE NERVO VAGO

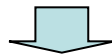
SOSTANZA RETICOLARE



CERVELLETTO

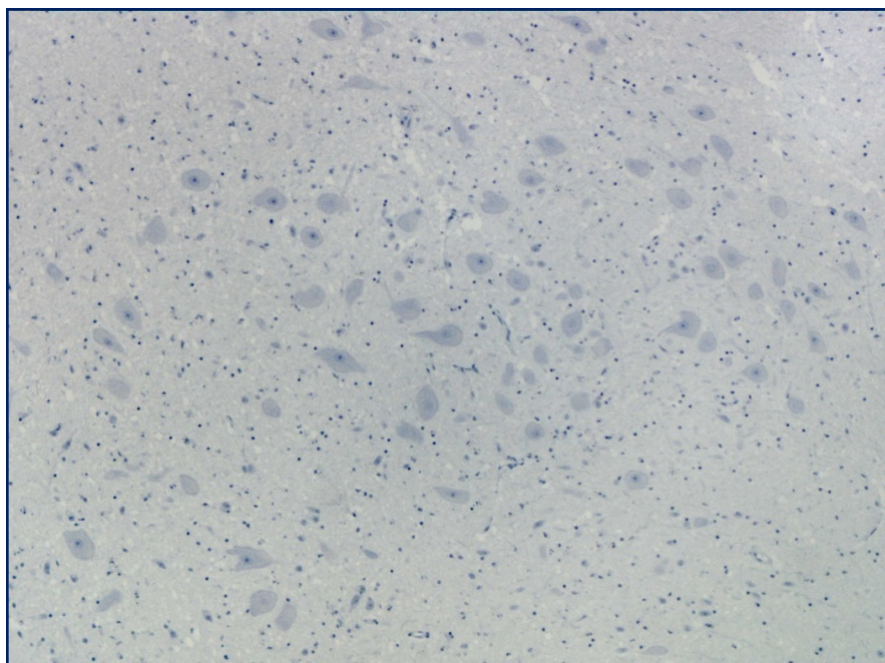


ESAME IMMUNOISTOCHEMICO

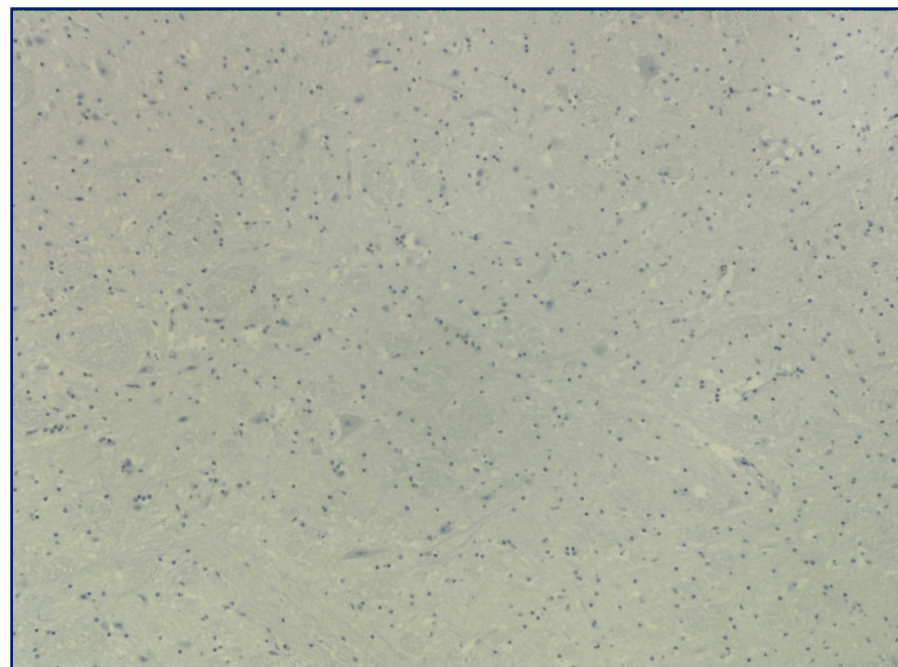


CAMPIONE NEGATIVO

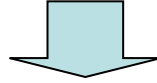
N. MOTORE DORSALE NERVO
VAGO



N. TRATTO SPINALE
TRIGEMINO

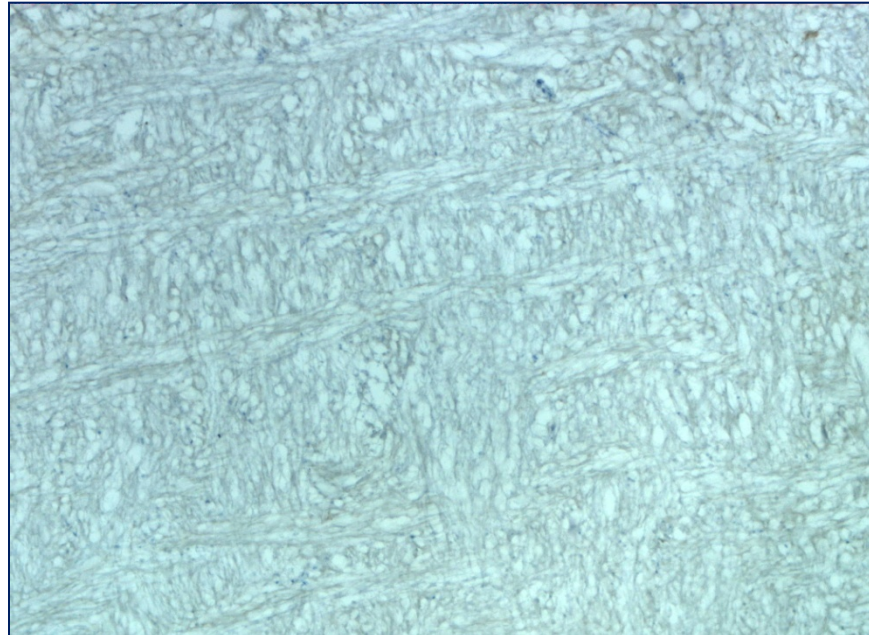


ESAME IMMUNOISTOCHIMICO



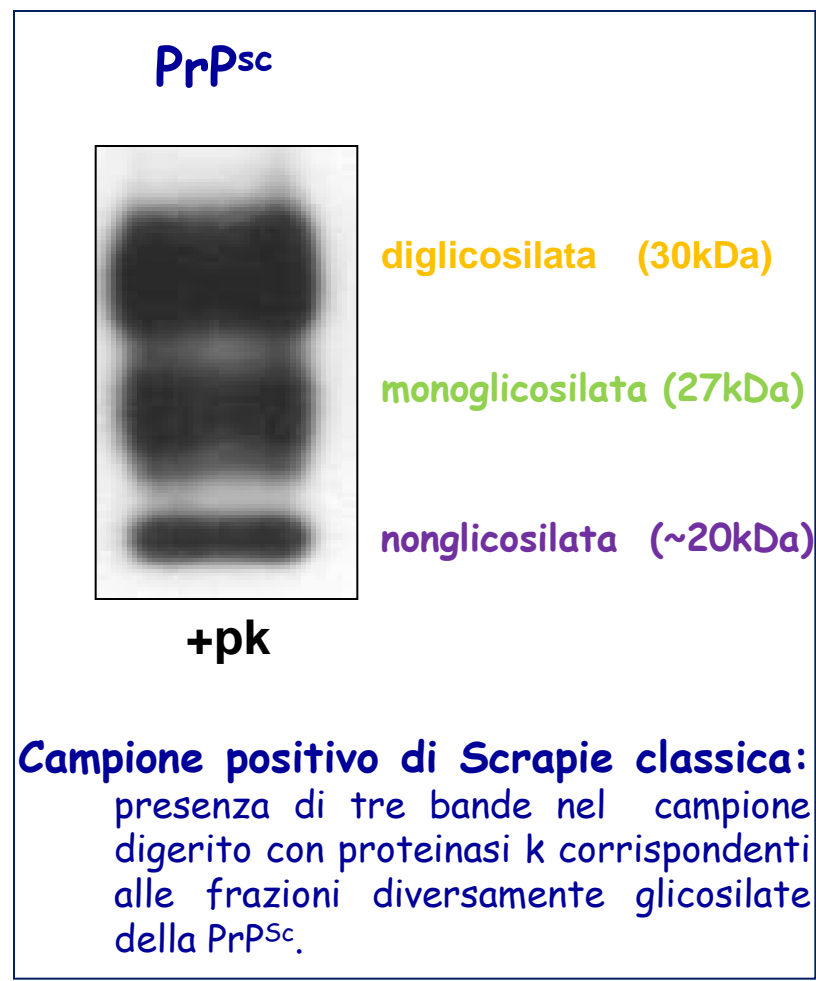
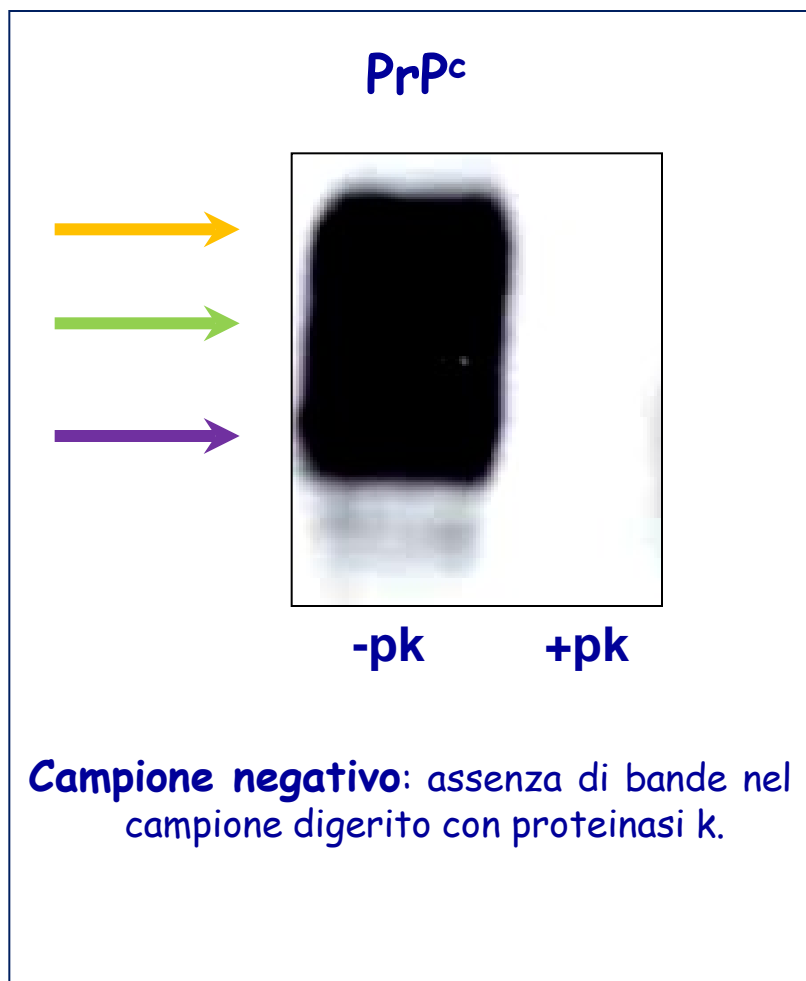
CAMPIONE NON VALUTABILE

- scarsa rappresentazione dei siti target
- presenza di modificazioni strutturali da autolisi o congelamento

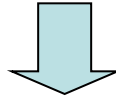


ESAME WESTERN BLOTTING

Campione negativo e positivo

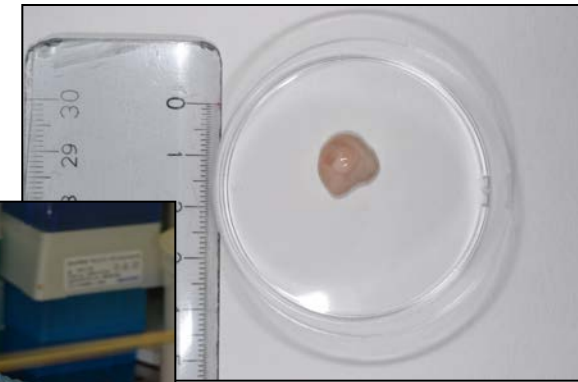


ESAME WESTERN BLOTTING

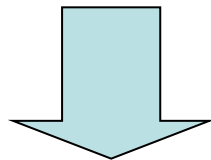


CAMPIONE NON VALUTABILE

Assenza di obex (campionamento inidoneo)

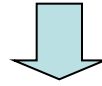


Obex non riconoscibile (c. autolitico)



CAMPIONE ANALIZZATO UGUALMENTE

ESAME WESTERN BLOTTING



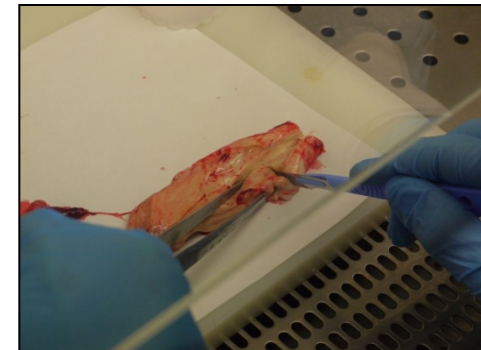
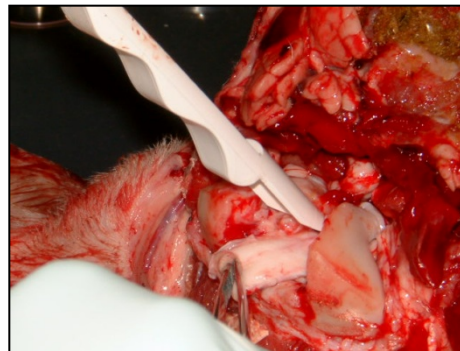
CAMPIONE NON ESEGUIBILE

Campione fissato
in formalina

Sospetta
cross-contaminazione

Prelievo tronco

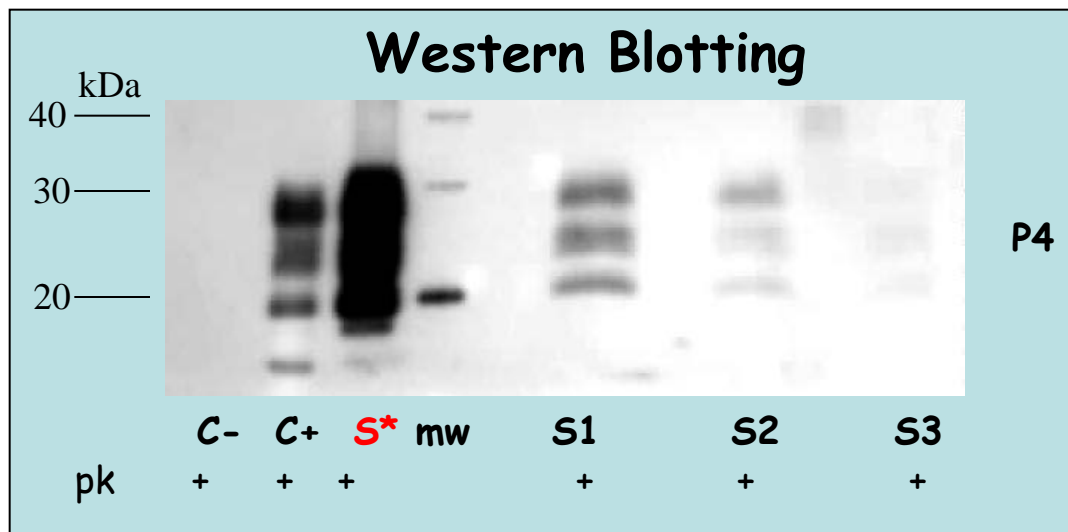
Taglio
test rapido





Simulazione di cross-contaminazione in laboratorio

1° campionamento del tronco di un caso di scrapie S^* (IDEXX O.D. 3.9) e tre tagli consecutivi del tronco di un caso negativo di scrapie, usando lo stesso bisturi per tutti i tagli. I campioni sono stati poi analizzati con il Western Blot.



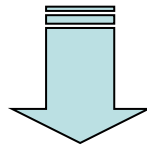
C- = controllo negativo di scrapie; C+, S^* = controllo positivo di scrapie; mw = pesi molecolari; S1, S2 and S3 = 1°, 2° e 3° campionamento .

Presenza di PrP^{Sc} con segnali decrescenti nei tre campioni.

Possibile trasferimento di PrP^{Sc} dal campione positivo al negativo.

Importante

- Confermare in particolare i casi index con tutti e tre i test
- Eseguire i campionamenti usando, se possibile, materiale monouso



CEA ha redatto nuove linee guida che sono stati inviati ai laboratori della rete IIZZSS al fine di ridurre i rischi di cross-contaminazione durante il prelievo del tronco o del taglio per il test rapido

CASI PARTICOLARI

Campioni positivi test rapido



Mancata conferma con IHC, HP e WB



Segnalazione al Ministero, alla ASL di competenza

Sorveglianza controllata

GRAZIE PER L'ATTENZIONE

