

Bijlage 1: Rapport van Dr. Deprez

(Deze tekst is niet beschikbaar in het Nederlands)

« Recommandation d'une autopsie du cerveau à l'occasion du prélèvement des osselets de l'oreille interne par voie transcrânienne et technique à utiliser pour la recherche du (v)CJD lors de cette autopsie. »

Dr Manuel Deprez
Laboratoire de Neuropathologie
CHU Sart Tilman
Université de Liège

Recommandation d'une autopsie à l'occasion du prélèvement des osselets de l'oreille moyenne

L'indication d'une autopsie cérébrale à l'occasion du prélèvement des osselets de l'oreille moyenne dépendra des facteurs suivants :

- 1) acte médical, dans ce cas le prélèvement tympano-ossiculaire pour allogreffe.
- 2) contagiosité des tissus
- 3) définition des patients à risque

I. Mode de prélèvement tympano-ossiculaire

A. Technique et abord

La technique proposée est le prélèvement autopsique « en bloc » de la chaîne tympano-ossiculaire par résection du rocher suivant un abord transcrânien. La voie d'abord par tympanotomie transcanaliculaire, préservant intacte les structures osseuses de l'oreille moyenne, et préconisée par d'autres équipes (Hotz 2002 ; Hotz, 2003 ; Hotz 2005), ne sera pas utilisée.

B. Désinfection/stérilisation

Le projet soumis prévoit une stérilisation par une solution de formaldéhyde tamponné à 2,7%. La procédure recommandée d'inactivation/stérilisation du Prion pathologique incluant par un traitement combiné chimique et thermique (Hotz 2002 ; Hotz, 2003 ; Hotz 2005) n'est pas envisagée dans le présent projet en vue de préserver la membrane tympanique.

II. Contagiosité des tissus

La greffe tympano-ossiculaire est utilisée depuis de nombreuses années dans la chirurgie reconstructive de l'oreille moyenne. La greffe d'osselets n'a jamais été associée, jusqu'à présent, à la transmission iatrogène de maladie à Prion, mais la durée d'incubation d'une éventuelle transmission par cette voie est encore inconnue. Les deux seuls cas de transmission possible de maladie à Prion associés à la chirurgie de l'oreille ont été décrits lors de l'emploi de matériel non-ossiculaire tel que dure-mère cadavérique (Iyodura®) et péricarde (revu dans Hotz 2003). La contagiosité des osselets, en première analyse, apparaît donc faible.

Cependant, la voie d'abord proposée ici, trans-crânienne avec résection en bloc du rocher, expose à une contagion à partir du LCR, de la dure-mère et des os de la base du crâne. Il faut dès lors considérer comme facteur déterminant non pas la contagiosité des osselets, mais celle des structures osseuses et de la dure-mère, laquelle est potentiellement élevée (rapport CSH 7276-2; Heath

2006). Ceci a conduit de nombreux pays à renoncer à l'emploi de ces allo/homogreffes tympano-ossiculaires. Un protocole SHIP (pour « Ossicle Selection-Harvesting-Inactivation-Preservation Protocol ») a été proposé afin de minimaliser le risque de transmission iatrogène des agents infectieux conventionnels et non-conventionnels (Hotz 2003). Ce protocole recommande en particulier un abord trans-canaliculaire et une désinfection par NaOH et autoclave. Les auteurs rapportent d'excellents résultats fonctionnels dans leur série de patients greffés après 5 ans (Hotz 2005).

Le projet qui nous concerne ne s'inscrit pas dans ce protocole SHIP en ce qui concerne le mode de collecte des osselets et leur désinfection/stérilisation. **L'unique moyen d'éviter la transmission iatrogène potentielle d'une maladie à Prion repose donc ici sur la sélection des donneurs.**

III. Définition des patients à risque

A. Considérations générales

L'évaluation du risque de transmission iatrogène d'une maladie à Prion est particulièrement difficile pour de nombreuses raisons. En particulier :

1. La durée d'incubation de la maladie peut être très longue (plusieurs dizaines d'années) et varie suivant le type de protéine prion pathologique (PrP^{res}) et le polymorphisme allélique du gène *PrP* du patient infecté. Pendant cette période subclinique, la PrP^{res} s'accumule dans certains tissus, en particulier le système nerveux central (revu dans Budka 2003 et Knight 2006). Comme dans de nombreuses maladies infectieuses, la contagiosité tissulaire précède donc les manifestations cliniques.
2. Il pourrait exister un état de « porteur sain » de maladie à Prion correspondant peut-être à une période d'incubation très prolongée. A nouveau, cet état serait déterminé par des facteurs liés à la souche de PrP^{res} et au polymorphisme allélique des individus contaminés (Hilton, 2004; Peden, 2004). La prévalence de tels « porteurs sains » de (v)CJD est actuellement mal déterminée mais elle représente une autre catégorie de donneurs potentiels contaminés mais asymptomatiques.
3. La présentation clinique du (v)CJD est très variable et le diagnostic peut en être tardif en milieu non spécialisé (revu dans Budka 2003 et Knight 2006).
4. Le lien direct entre la contagiosité tissulaire et la présence de PrP^{res} n'est pas toujours bien établi en ce qui concerne les tissus humains. Par exemple, s'il existe des cas confirmés de transmission maladie à Prion par allogreffe de dure-mère cadavérique, la PrP^{res} n'a jamais été démontrée dans la dure-mère de patients décédés de (v)CJD (Heath 2006). Il en est de même en ce qui concerne les rares cas de transmission possible de maladie à Prion par greffe de cornée. En effet, si des extraits de cornée injectés expérimentalement dans la chambre antérieure de l'œil ont pu transmettre la maladie chez des animaux

de laboratoire, la greffe de cornée chez ces mêmes animaux n'y est jamais parvenue. De plus, il n'a jamais été possible de détecter la protéine PrP^{res} dans la cornée de patients décédés de CJD ou de vCJD (revu dans Moffatt 2006; Hogan 1995).

5. Il faut évidemment garder à l'esprit le bénéfice que représentent de telles allogreffes pour les patients nécessitant une chirurgie reconstructive de l'oreille moyenne et la discordance actuelle entre risque potentiel et risque actuellement objectivé pour la transmission iatrogène de maladies à prion (à l'exception notable des extraits hypophysaires et de la dure-mère avant 1992). A titre d'exemple, la transplantation cornéenne est une intervention très fréquente, pratiquée dans le monde entier, et seuls 3 cas suspects de transmission iatrogène ont été rapportés dont un seul paraît très probable, les deux autres étant probables ou possibles (Moffatt 2006 ;Tullo 2006). Par ailleurs, comme rappelé ci-dessus, la greffe ossiculaire n'a jamais été elle-même associée à la transmission d'une maladie à prion malgré sa fréquence.

B. Recommandations

Les recommandations énoncées dans le rapport CSH n° 7276-2 (annexe 2) pour la définition des patients à risque font l'objet d'un large consensus. En ce qui concerne la sélection des donneurs pour prélèvement tympano-ossiculaire par voie trans-crânienne, je suggère les critères d'exclusion suivants :

1. Sont exclus tous les patients à haut risque de (v)CJD : les patients avec un CJD probable ou confirmée ne peuvent en aucun cas faire l'objet d'un prélèvement tympano-ossiculaire. Les patients atteints de CJD possible doivent aussi être exclus. Il convient toutefois d'apprécier que parmi les donneurs potentiels, on trouvera beaucoup de patients âgés atteints de démence chronique d'origine neurodégénérative, vasculaire ou même alcoolique, dont la présentation rapportée par la famille est celle d'une démence subaiguë, le diagnostic de démence précoce étant souvent difficilement posé par les proches du patient. De plus, l'association démence subaiguë avec des signes pyramidaux ou extrapyramidaux est également assez peu spécifique et relativement fréquente. Il en résulte que dans la population âgée, de nombreux patients seront exclus du prélèvement tympano-ossiculaire. Ceci diminuera certainement le nombre de candidats donneurs mais il me semble que cette précaution est impérative compte tenu de la contagiosité potentielle de la technique de prélèvement et de l'absence de procédure de stérilisation.

2. Sont exclus tous les patients à risque intermédiaire tels que définis dans le rapport CSH 7276-2. Cette recommandation rejoint celle formulée par le Royal College of Ophthalmologists en ce qui concerne la greffe de cornée (RCOphthalm 2004).

3. Patients à risque négligeable au sens du rapport CSH 7276-2.
Il s'agit de la catégorie la plus difficile à évaluer.

La prévalence des cas de (v)CJD subcliniques et des porteurs sains est largement inconnue et difficilement évaluable. La détection systématique de tels cas subcliniques n'est pas envisageable à l'heure actuelle . On ne peut raisonnablement définir les critères d'exclusion qu'en fonction des risques connus à ce jour, en acceptant une révision régulière de ces critères. En Belgique, où aucun cas de vCJD n'a été rapporté jusqu'à présent, le risque de transmission concerne surtout les cas de CJD sporadiques (sCJD). Les cas familiaux sont dix fois moins fréquents et sont envisagés dans un paragraphe précédent. Avec une incidence de sCJD inchangée de 1 cas/million d'habitants/an, le risque pour un donneur potentiel de développer la maladie au cours de sa vie a été évalué à 1/40.000 au Royaume Uni (Allan 1997). En tenant compte des cas subcliniques et d'une période d'incubation de 10 ans en moyenne, Hogan calcule que, en l'absence de toute sélection des donneurs, seulement 0.0005% des donneurs de cornée serait susceptible d'avoir développé un sCJD clinique ou subclinique (Hogan, 1995).

Cependant, les premiers troubles neurologiques manifestés par les patients atteints de (v)CJD sont variés et le diagnostic précoce de cette maladie peut être difficile en milieu non spécialisé. Suivant en cela les recommandation du Royal College of Ophthalmologists, **nous recommandons l'exclusion des patients ayant une histoire de maladie neurologique ou d'atteinte du système nerveux central dont l'étiologie est à ce jour inconnue (incluant les maladies neurodégénératives et la sclérose en plaques). En ce qui concerne les patients décédés d'une cause inexplicée, le prélèvement est autorisé à la condition qu'une autopsie cérébrale soit pratiquée.**

Les critères d'exclusion concernant le risque infectieux général et local (ex : HIV, otite moyenne...) doivent aussi être respectés. Ils ne sont pas envisagés ici car ils ne font pas l'objet de la demande spécifique du CSS.

Technique d'autopsie cérébrale

I. Mesures recommandées pour l'autopsie et le laboratoire d'anatomopathologie

Ces mesures sont détaillées dans le rapport CSH 7276-2.

II. Techniques de diagnostic d'une maladie à Prion (d'après Budka, 2003)

A. Aspect macroscopique et sélection des prélèvements

Il n'y a pas d'aspect macroscopique spécifique ou suggestif de (v)CJD. De plus, la distribution et la sévérité des modifications pathologiques varient beaucoup suivant les cas et dès lors, on recommandera un échantillonnage assez large.

Il faut idéalement garder un large fragment de cortex cérébral et un fragment de cortex cérébelleux pour congélation en vue des études de western blot, immunoblot et génétique moléculaire. Ces échantillons sont manipulés et conservés suivant les normes applicables au matériel hautement infectieux.

Le cerveau est ensuite mis à fixer dans une solution de formol 20%. Après fixation, les prélèvements suivants sont réalisés pour la recherche de maladie à Prion :

- cortex frontal antérieur (pré-frontal) à hauteur du pôle temporal
- cortex temporal à hauteur du noyau lenticulaire
- cortex pariétal du lobule pariétal inférieur
- cortex occipital visuel primaire (area striata)
- noyau caudé
- noyau lenticulaire
- thalamus
- cortex cérébelleux

En outre, il faut échantillonner toutes les lésions cérébrales focales ainsi que les aires anatomiques dont les fonctions paraissent altérées sur base de l'histoire clinique.

Ces échantillons sont ensuite traités pendant une heure à l'acide formique 92-98% avant déshydratation et inclusion en paraffine.

B. Aspect microscopique

L'aspect caractéristique des maladies à Prion est celui d'une encéphalopathie spongiforme associant perte neuronale, gliose et spongiose.

Un aspect spongiforme peut toutefois être observé dans d'autres formes de démence comme la maladie d'Alzheimer ou la démence à corps de Lewy.

De plus, l'intensité de la spongiose est très variable suivant le type de maladie à Prion. **Dès lors, le diagnostic neuropathologique repose impérativement sur la mise en évidence de la PrP^{res}.**

Dans le cadre du projet qui nous occupe, cette recherche de PrP^{res} devra être menée même en l'absence d'image d'encéphalopathie spongiforme sur au moins trois blocs, par exemple cortex visuel, cortex cérébelleux et tête du noyau caudé ou cortex pariétal.

C. Mise en évidence de la PrP^{res}

Immuno-histochimie, Western Blot et Immunoblot et immuno-PCR

La détection immuno-histochimique de la PrP^{res} est une technique délicate. En effet, les anticorps disponibles ne sont pas spécifiques de la conformation de la protéine PrP et ne distinguent pas entre PrP et PrP^{res}. De plus, la PrP^{res} est présente dans le tissu cérébral sous forme de dépôts amyloïdes insolubles. La procédure doit donc d'une part détruire la PrP par la protéinase K afin de ne laisser que la PrP^{res}, et détruire les amas amyloïdes pour permettre l'exposition des épitopes de la PrP^{res} à l'anticorps de détection (généralement par thiocyanate de guanidine). Les anticorps les plus fréquemment utilisés sont les 3F4, 12F10, 6H4, KG9 et BG4 (Ade-Biassette, 2006).

Il existe un risque de faux positif et de faux négatif et l'interprétation du marquage immuno-histochimique est délicate. C'est pourquoi cet examen doit être réalisé dans un des cinq centres habilités pour le diagnostic neuropathologique des maladies à Prion (Annexe 8 du rapport CSH 7276-2). L'examen immuno-histochimique doit être associé à une étude par western blot (Ingrosso, 2002), immunoblot (Wadsworth, 2001) ou immuno-PCR (Gofflot, 2005). Ces techniques permettent de confirmer la présence de PrP^{res} et d'en préciser le type. Elles sont idéalement réalisées sur du matériel frais ou congelé mais certains groupes les ont aussi appliquées avec succès sur du matériel inclus en paraffine (Ritchie, 2004).

Conclusions

La technique proposée pour le prélèvement tympano-ossiculaire est potentiellement associée à un risque élevé de contagiosité puisqu'elle inclut une exposition à la dure-mère et au tissu osseux.

Le protocole proposé ne prévoit pas d'étape de stérilisation/inactivation efficace contre la PrP^{res} et la prévention d'une transmission iatrogène par allogreffe repose entièrement sur la sélection des donneurs.

Pour les raisons précitées, nous avons opté pour une attitude conservatrice, en nous référant particulièrement aux recommandations émises par le Royal College of Ophthalmologists du Royaume-Uni en matière de greffe de cornée.

Il en résulte que tous les patients présentant un risque élevé ou intermédiaire de (v)CJD doivent être exclus du groupe des donneurs, de même que les patients à risque négligeable de (v)CJD mais présentant une histoire de maladie du système nerveux central.

Les patients à risque négligeable de (v)CJD décédés sans cause clairement établie pourront être donneurs mais une autopsie cérébrale devra être pratiquée pour exclure une maladie à Prion éventuelle. Sur base du résultat de cette autopsie, le tissu pourra ou non être greffé chez un receveur vivant.

Les autres patients à risque négligeable de (v)CJD pourront être acceptés comme donneurs sans autre réserve.

Pour terminer, il faut insister sur le besoin impératif de disposer d'une histoire médicale détaillée du donneur potentiel avant de procéder à tout prélèvement.

Références

1. Adle-Biassette H et al. J Neuropathol Exp Neurol 2006; 65(7): 698-706
2. Allan B. Et al. Br Med J 1997; 315: 1553-4
3. Budka H. British Med Bul 2003; 66:121-130
4. Gofflot S et al. Clin Chem 2005; 51(9): 1605-611
5. Heath CA et al. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2006; 77:880-82
6. Hilton DA et al. J Pathol 2004; 203: 733-39
7. Hogan N. Cornea 1995; 14(6): 547-53
8. Hotz MA et al. Transplantation Proceedings 2002; 34 :1325-26
9. Hotz MA et al. Laryngoscope 2003; 13 :1274-5
10. Hotz MA et al. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 2005; 67(1): 34-8
11. Ingrosso L et al. Trends Mol Med 2002 ; 8 : 273-80
12. Knight R. Clin Infect Dis 2006; 43: 340-46
13. Moffatt SL. Clin Exp Ophtalm 2006 ; 34 : 635-636
14. Peden AH et al. Lancet 2004; 264 : 527-29
15. Ricthie DL et al. Neuropathol appl Neurobiol 2004; 30: 360-68
16. Royal College of Ophthalmologists. June 2004. Guidance on the retrieval of human ocular tissue used in transplantation and research. On <http://www.rcophth.ac.uk>
17. Tullo AB. Clin Exp Ophtalm 2006 ;34 :645-49
18. Wadsworth JD et al. Lancet 2001 ; 358 :171-80

Bijlage 2: Definitie van risicopatiënten

(HGR 7276-2 "Aanbevelingen ter voorkoming van de overdracht van de overdraagbare spongiforme encefalopathieën (ziekte van Creutzfeldt-Jakob)" punt 4.1.)

Patiënten kunnen, wat betreft de kans op overdracht van OSE, ingedeeld worden in drie categorieën:

1) patiënten met een **hoog** risico zijn patiënten met mogelijke, waarschijnlijke of bevestigde OSE.

De diagnostische criteria die toelaten om patiënten in te delen als mogelijke, waarschijnlijke of bevestigde OSE worden in tabellen 1 en 2 gegeven.

2) patiënten met een **matig** risico zijn asymptomatische patiënten die een potentieel risico lopen om een ziekte van Creutzfeldt-Jakob te ontwikkelen, met name:

- a) patiënten die een dura-mater-ent, hoornvlies of sclera ontvangen hebben;
- b) patiënten die een behandeling hebben ondergaan met geëxtraheerde hypofysaire hormonen (groeihormoon, gonadotrofijnen, ...);
- c) eerstegraadsfamilieleden van een patiënt met ziekte van Creutzfeldt-Jakob;
- d) patiënten die na 1980 een transfusie met bloedbestanddelen gekregen hebben in het Verenigd Koninkrijk.

3) patiënten met verwaarloosbaar risico beantwoorden niet aan bovenstaande criteria.

Tabel 1: Criteria voor de diagnose van een sporadische vorm van de ziekte van Creutzfeldt-Jakob.

Deze criteria worden ook gehanteerd voor de gevallenaangifte.

Mogelijke CJD	Snel evoluerende dementie (< 2 jaar) plus minstens 2 van de volgende klinische tekens: myoclonie (vroegtijdig optredend), visusstoornis (vroegtijdig optredend), cerebellaire stoornis, pyramidale of extrapyramidale tekens of akinetisch mutisme
Waarschijnlijke CJD	Snel evoluerende dementie met typisch EEG (traag en diffuse dysritmie met periodieke piekgolf complexen) en/of proteïne 14-3-3 aangetoond in cerebrospinaal vocht plus minstens 2 van de volgende klinische tekens: myoclonie (vroegtijdig optredend), visusstoornis (vroegtijdig optredend), cerebellaire stoornis, pyramidale of extrapyramidale tekens of akinetisch mutisme
Bevestigde CJD	Mogelijke of waarschijnlijke CJD bevestigd door neuropathologisch onderzoek

Tabel 2: Criteria voor de diagnose van een variante vorm van de ziekte van Creutzfeldt-Jakob.

Deze criteria worden ook gehanteerd voor de gevallenaangifte. De routineonderzoeken wijzen niet op een andere diagnose en er bestaat geen antecedent van potentiële iatrogene blootstelling.

Mogelijke vCJD	<p>Progressieve neuropsychiatrische stoornis Duur van de ziekte > 6 maanden plus minstens 4 van de volgende klinische tekens: vroege psychiatrische symptomen aanhoudende pijnlijke sensibiliteitsstoornissen ataxie myoclonus of chorea of dystonia dementie</p>
Waarschijnlijke vCJD	<p>Progressieve neuropsychiatrische stoornis met EEG EEG vertoont niet de typische verschijnselen van klassieke CJD Gegeneraliseerde trifasische periodieke complexen, ongeveer 1 per seconde En hoog signaal op de MRI-scan in het posterieur thalamisch gedeelte of met positieve amandelbiopsie plus minstens 4 van de volgende klinische tekens: vroege psychiatrische symptomen aanhoudende pijnlijke sensibiliteitsstoornissen ataxie myoclonus or chorea or dystonia dementia</p>
Bevestigde vCJD	<p>Mogelijke of waarschijnlijke VCJD bevestigd door neuropathologisch onderzoek Spongiforme verandering en uitgebreide PrP-depositie met floride plaques in het cerebrum en cerebellum</p>

Bijlage 3: Aanbevelingen voor maatregelen bij autopsie en in het anatomopathologisch laboratorium

(HGR 7276-2 "Aanbevelingen ter voorkoming van de overdracht van de overdraagbare spongiforme encefalopathieën (ziekte van Creutzfeldt-Jakob)" punt 7.6.)

7.6.1. Algemeen

Autopsie van patiënten met een hoog risico van OSE wordt alleen in een gespecialiseerd centrum uitgevoerd.

De monsters moeten voor OSE gemarkeerd naar het anatomopathologisch laboratorium worden verstuurd, vermits daar extra maatregelen getroffen moeten worden.

7.6.2. Personeel

Tijdens autopsie van patiënten met een hoog of matig risico draagt het personeel:

- wegwerpkleding en een waterdichte schort,
- een masker met een oogscherm of masker en bril zodat ogen, mond en neus volledig bedekt zijn,
- onder de wegwerphandschoenen bij voorkeur ook veiligheidshandschoenen in teflon of metaal.

7.6.3. Orgaanafname

Men preleveert de hersenen in laatste instantie om besmetting van de andere organen te vermijden.

Men opent het schedeldak met behulp van een handzaag of een elektrische zaag die beschermd is door een kap uit kunststof.

Men identificeert de monsters duidelijk als besmet en bewaart ze in hermetisch gesloten recipiënten waarvan de buitenkant met een natriumhypochlorietoplossing 20.000 ppm is ontsmet.

7.6.4. Behandeling van monsters

Formaldehyde inactieveert de prionen niet. De met formaldehyde gefixeerde weefsels moet men dus nog steeds met dezelfde voorzorgen behandelen als verse weefsels.

Na fixatie dient men de hersenmonsters gedurende 1 uur te behandelen met een oplossing van mierenzuur 92-98 %. Daarna mag men de monsters versnijden met een standaardmicrotoom met wegwerpmes. De microtoom moet op een ondoordringbare wegwerpdoek geplaatst zijn.

De monsters worden duidelijk geïdentificeerd en bewaard in hermetisch gesloten recipienten waarvan de buitenkant met een natriumhypochlorietoplossing aan 20.000 ppm wordt ontsmet.

7.6.5. Reiniging

Alvorens te reinigen moet men elke zichtbare vlek van bloed of lichaamsvochten gedurende 30 minuten in contact laten met een oplossing van natriumhypochloriet 20.000 ppm.

De werkbank en de vloer worden ontsmet met een natriumhypochlorietoplossing 20.000 ppm en vervolgens gereinigd.

7.6.6. Afval

De overblijfselen, wegwerpkledij, doeken, ... worden verwijderd als medisch risicohoudend afval.

7.6.7. Materiaal

Instrumenten voor meermalig gebruik worden behandeld volgens de hierboven beschreven procédés die prionen inactiveren. Na reinigen kan chemische of thermische ontsmetting volstaan daar de materialen geen contact hebben met levende patiënten.

7.6.8. Accidentele blootstelling

De preventie van prik- en snijongevallen is voor de anatomopatholoog van primordiaal belang. Alle incidenten moeten aan de arbeidsgeneesheer en de dienst voor Preventie en Bescherming op het Werk meegedeeld worden.