

Encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE). Amiloidosi cerebrali trasmissibili

A cura di Giovanni DI GUARDO e Paolo Stefano MARCATO

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE = *Transmissible spongiform encephalopathies*) sono un gruppo di malattie neurodegenerative che colpiscono l'uomo e gli animali. Esse sono caratterizzate da un lungo periodo d'incubazione, da un decorso clinico progressivo con sintomatologia neurologica centrale ed esito costantemente fatale, dall'assenza di reazioni immunitarie ed infiammatorie (o quantomeno di reazioni infiammatorie "classicamente" intese come tali), da lesioni esclusive del sistema nervoso centrale (SNC), di tipo essenzialmente regressivo (distrofia neuroassonale, malattia neurodegenerativa), nonchè dalla **trasmissibilità** ad una varietà di specie animali.

Se la *scrapie* della *pecora* e della *capra*, descritta per la prima volta nel Regno Unito nel 1732 ed unanimemente considerata il "prototipo" di tali malattie, era la sola TSE animale nota fino a 40 anni orsono, la comparsa, a metà degli anni '80, dell'epidemia di **encefalopatia spongiforme bovina (BSE)** nel Regno Unito ha drasticamente modificato lo "scenario" delle TSE, fornendo un notevole impulso alla ricerca scientifica nei confronti di tali malattie. Ad avvalorare ulteriormente tale affermazione si pongono pure le numerose TSE descritte, sempre nel Regno Unito, in diverse specie animali domestiche (*gatto*) e selvatiche (felidi e *ruminanti* selvatici mantenuti in cattività all'interno di giardini zoologici), nonchè nell'uomo (**variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob, vCJD**, in giovani pazienti inglesi), quale conseguenza dell'esposizione (**prevalentemente o esclusivamente** per via orale, con ogni probabilità) all'agente della BSE. In tal senso, appare più che lecito definire la BSE una nuova zoonosi e l'unica TSE animale, al tempo stesso, per la quale sia stato chiaramente documentato un potenziale zoonosico.

Le TSE finora riconosciute e descritte nell'uomo e negli animali sono rappresentate nella **tabella 5**.

Tabella 5. *Encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) nell'uomo e negli animali.*

Uomo

Malattia di Creutzfeld-Jakob (CJD)
- CJD sporadica
- CJD iatrogena
- CJD familiare
Malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)
Insonnia familiare fatale (FFI)
[Insonnia sporadica fatale](#)
Kuru
Variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob (vCJD)

Animali

Scrapie (*Pecora, capra*, muflone)
Encefalopatia spongiforme bovina (BSE) (*Bovino*)
Encefalopatia spongiforme felina (FSE) (*Gatto*, puma, ocelot, ghepardo, tigre, leone)
Encefalopatia trasmissibile del visone (TME) (Visone)
Malattia del dimagrimento cronico (CWD = *Chronic wasting disease*) (Cervidi)

Da un punto vista strettamente patologico, le TSE possono essere classificate tra le **amiloidosi cerebrali (beta-fibrillosi)**, ragion per cui tali malattie sono conosciute anche con la denominazione di **amiloidosi cerebrali trasmissibili**. Sebbene non in tutti i casi sia presente l'amiloidosi sotto forma di tipici depositi a placca o perivasali, la denominazione deriva da un fenomeno comune, il deposito intracellulare, nei neuroni, di una particolare proteina amiloidea, la **PrP^{Sc}** (da *Scrapie-associated Prion Protein*), che rappresenta l'isoforma alterata di una sialoglicoproteina di membrana denominata **PrP^C** (da *Cellular Prion Protein*). Tale proteina svolge un ruolo cruciale nella patogenesi delle TSE ed è peraltro responsabile dello sviluppo delle lesioni a livello del SNC. Rimane tuttavia ancora da chiarire, in maniera definitiva, quale sia il suo significato eziopatogenetico, vale a dire se essa stessa rappresenti l'agente responsabile delle TSE, come sostenuto dalla "teoria prionica" di Prusiner, o costituisca altresì un semplice prodotto patologico dell'infezione, come ipotizzato dalla "teoria virale". Al riguardo, va precisato che la "teoria prionica", secondo la quale l'agente causale delle TSE sarebbe costituito da una struttura proteica - il **prione** (acronimo da *proteinaceous infectious particle*), appunto - priva di acidi nucleici e corrispondente alla PrP^{Sc}, è senz'altro quella che gode di maggior credito, risultando pressochè unanimemente accettata dagli studiosi, tant'è che un'ulteriore frequente denominazione delle TSE è quella di **malattie prioniche** o **malattie da prioni** (*prion diseases*). In ossequio a tale ipotesi eziologica, per indicare la moltiplicazione del prione sarebbe più appropriato parlare di "amplificazione" invece di replicazione, che è una prerogativa degli agenti infettivi dotati di acido nucleico.

La **teoria prionica**, seppure comprovata da una nutritissima serie di dati ed evidenze sperimentali, spiega tuttavia con maggior difficoltà, rispetto alla teoria virale, l'esistenza di più ceppi di agente della scrapie, tutti ben caratterizzati dal punto di vista clinico, istopatologico e biochimico, fenomeno quest'ultimo difficilmente plausibile in assenza di possesso, da parte dell'agente causale, di acidi nucleici. Ciò collide infatti con un dogma centrale della biologia molecolare, che postula che gli agenti infettivi che trasmettono malattie debbano possedere acidi nucleici per propagare l'infezione in un organismo ospite. La scoperta dei prioni ha dimostrato che anche senza l'ausilio degli acidi nucleici una proteina può moltiplicarsi e provocare malattia.

Alla suddetta teoria si contrappone l'**ipotesi virale**, che considera l'agente eziologico costituito da un piccolo acido nucleico associato ad una o più proteine da esso codificate. A queste si aggiunge infine una terza ipotesi causale, quella del **virino**, secondo cui l'agente sarebbe costituito da un acido nucleico associato ad una proteina codificata dall'ospite. Quest'ultima teoria sarebbe peraltro in grado di spiegare, al pari di quella prionica, la mancata reazione immunitaria da parte dell'organismo ospite costantemente osservata in corso di TSE umane ed animali. Una variante di quest'ultima ipotesi (teoria dell' **oloprione**) suggerisce infine che anche l'acido nucleico sia di origine cellulare, con la particella infettante costituita da PrP^{Sc} (**apoprione**) ed acido nucleico (**coprione**).

Alla luce di quanto sopra esposto, appare più che ragionevole definire gli agenti eziologici di tali malattie "agenti biologici di natura non convenzionale", concetto assolutamente avvalorato quest'ultimo dall'elevatissima resistenza dei medesimi nei confronti di un'ampia gamma di fattori chimico-fisici, quali ad esempio il calore e le radiazioni ultraviolette in condizioni sicuramente inattivanti per i virus convenzionali. L'inattivazione, o quantomeno l'abbattimento della carica infettante (infettività), richiedono

infatti l'impiego di una temperatura di 133°C a 3 bar per 20 min., oppure in alternativa l'utilizzo di soluzioni disinfettanti clorate (al 2% almeno di cloro attivo), di NaOH 2N per 1 h (oppure 1N per 2 h), o di acido formico al 95-100% per 1 h).

La **conversione post-traslazionale della PrP^C in PrP^{Sc}** rappresenta l'evento dominante che caratterizza la patogenesi delle TSE. Più in particolare, tali malattie presentano una singolare complessità patobiologica, dovuta al fatto che nel determinare il processo lesivo che le contraddistingue si vedono convergere un fattore eziologico trasmissibile ("infettivo" *sui generis*) esogeno ed un fattore eziologico genetico endogeno, cioè proprio dell'ospite.

Il primo di questi è costituito dalla forma più piccola della **proteina prionica (PrP)** avente potere infettante (PrP^{Sc}), un polipeptide di 27-30 kDa (PrP 27-30). I principali determinanti della patogenicità molecolare della PrP^{Sc} risiedono nella sua struttura secondaria, cioè nella configurazione dell'ordinamento spaziale delle catene polipeptidiche, che è quello delle proteine fibrillari insolubili in acqua (come il collagene dei tessuti connettivi, la cheratina dei capelli e la fibroina della seta), che hanno una struttura a "foglietti-β" (o "lamine-β"), ossia a foglietti ripiegati (o lamine pieghettate). Le catene peptidiche sono ripiegate rispetto ai radicali liberi contenenti atomi di carbonio e sono collegate tra loro da legami di idrogeno disposti perpendicolarmente rispetto alla direzione delle catene; si viene così a formare una specie di foglietto pieghettato, al di sopra e al di sotto del quale sporgono i radicali liberi degli aminoacidi.

La PrP^{Sc} può essere dimostrata con la microscopia elettronica a trasmissione a contrasto negativo su omogenati di tessuto cerebrale trattati con idonei detergenti, dove appare con l'aspetto di caratteristiche fibrille note come **SAF (Scrapie-associated fibrils)** o **prion rods**. Le fibrille (di 20 nm di diametro e di 100-200 nm di lunghezza) sono composte da 2-3 protofilamenti dritti o talvolta attorcigliati, di 4-6 nm di diametro.

La base genetica delle malattie prioniche risiede nell'esistenza, nel genoma di tutti i vertebrati e con essi di molti altri organismi viventi, compresi quelli zoologicamente meno evoluti, di un gene (**Prnp**) che codifica per la sequenza aminoacidica della proteina prionica (PrP^C). In alcune specie, quali topo, **pecora**, uomo e, più recentemente, anche **capra** e cervo nobile (*Cervus elaphus nelsoni*), sono stati identificati, in corrispondenza di determinate posizioni della sequenza nucleotidica del gene *Prnp* (denominato in passato **Sip**, da **Scrapie incubation period** e **Sinc**, da **Scrapie incubation**, rispettivamente nella **pecora** e nel topo) o, per meglio dire, della sua regione biologicamente attiva (**Open reading frame**, ORF), localizzata a livello del terzo esone, tutta una serie di polimorfismi genetici. Questi sono attualmente oggetto di accurate indagini in numerose razze ovine, alcune delle quali nostrane, e sono stati a loro volta correlati, singolarmente (come ad esempio nel caso della razza Suffolk e della razza Sarda) o in associazione (come nel caso della razza Cheviot e della razza Comisana), con un'accresciuta oppure con una ridotta suscettibilità genetica nei confronti della scrapie. A tal proposito, appare più che giustificato affermare che il fenotipo clinico-patologico di malattia di volta in volta osservato costituirà, in presenza di scrapie come di altre TSE animali ed umane, spontanee e sperimentali, il prodotto dell'interazione fra il ceppo di agente responsabile ed il genotipo dell'ospite.

E' opportuno, a questo punto, proporre un altro fondamentale concetto nell'ambito della complessa ed articolata biologia delle TSE, vale a dire quello relativo alla cosiddetta "barriera di specie". Secondo tale concetto, alla cui conoscenza hanno ampiamente contribuito gli studi su animali transgenici (topi, *in primis*), la trasmissibilità interspecifica

di uno o più casi di TSE, sia in condizioni naturali, sia in condizioni sperimentali, dipenderà in larghissima parte, a prescindere dalla via di trasmissione utilizzata (che comunque rappresenta, a sua volta, un altro importante fattore in grado di condizionare l'efficienza di trasmissione), dalla percentuale di omologia di sequenza aminoacidica, o di struttura primaria, fra la PrP^{Sc} dell'agente, da un lato, e la PrP^C dell'ospite, dall'altro. In generale, al crescere dell'omologia di sequenza risulteranno pure aumentate, di pari passo, le probabilità di trasmissione interspecifica, **sebbene un'accentuata attività replicativa dell'agente infettante sia stata recentemente dimostrata nel topo, pur in assenza di sintomatologia clinica, a seguito d'infezione sperimentale sostenuta dal ceppo Sc237 di scrapie del criceto.** Ciò, oltre a generare una serie di possibili implicazioni in ambito di sanità pubblica, contribuisce a porre in discussione il concetto di "barriera di specie", almeno in quella che finora è stata la sua "classica" accezione, **fortemente basata su parametri di tipo clinico.**

Le funzioni biologiche della PrP^C, prodotta normalmente dalle cellule (neuroni, soprattutto), ma priva di potere patogeno per l'ospite e non in grado di trasmettere la malattia prionica ad altri animali, rimangono tuttora **in buona parte oscure**, senza che sia stata peraltro dimostrata alcuna significativa omologia di sequenza nei confronti di tutte le altre proteine note (ad eccezione della proteina "doppel", di cui si dirà in seguito). In proposito, **la localizzazione della PrP^C sulla superficie cellulare ha consentito di ipotizzare che tale proteina sia coinvolta in segnali di adesione cellulare o, in alternativa, in funzioni di trasporto e trasduzione del segnale, mentre secondo recenti studi la PrP^C sarebbe dotata di attività antiossidante grazie alla sua capacità di chelare gli ioni rame (Cu⁺⁺), il cui sito di legame si trova a livello della regione carbossiterminale (C-terminale) della molecola, in corrispondenza di un lungo braccio disarticolato di quest'ultima. Di particolare interesse è inoltre il supposto ruolo anti-apoptotico della PrP^C, presumibilmente mediato dall'interazione con l'oncogene Bcl-2.** Ancora in merito alle funzioni biologiche della PrP^C, **è opportuno sottolineare che i diversi esperimenti effettuati su topi transgenici, cioè deprivati del gene che codifica per la PrP^C, hanno prodotto risultati contrastanti, sebbene sia stato inconfutabilmente dimostrato che la mancata espressione della PrP^C da parte dell'ospite non consente nè la replicazione dell'agente, nè tantomeno la comparsa e la successiva progressione della malattia.** Successivi studi condotti ancora su topi transgenici - modelli animali dei quali la ricerca scientifica sulle TSE si è fortemente avvalsa nel corso di questi ultimi anni e grazie al cui utilizzo sono state raggiunte alcune fondamentali acquisizioni su tali malattie - hanno permesso di identificare un nuovo gene (*Prnd*), a sua volta codificante per una proteina simil-prionica denominata **doppel (Dpl)** e già prodotta nel corso della vita embrionale, ma i cui livelli di espressione nel SNC sarebbero, al contrario della proteina prionica (PrP^C), estremamente ridotti. **Livelli di espressione dell'mRNA di Dpl d'entità ben più marcata sarebbero invece presenti a livello di testicolo, cuore e, in minor misura, a livello di milza, ovaio, muscolatura scheletrica e, limitatamente alla prima settimana di vita nel topo, anche a livello degli endoteli vasali del SNC, delle mucose (mucosa intestinale) e della milza, informazione quest'ultima da cui discende peraltro la recentissima ipotesi che la proteina Dpl sia coinvolta nella maturazione della barriera emato-encefalica.** Tale proteina, **strutturalmente, funzionalmente e biologicamente correlata alla PrP^C, risulta formata nella specie murina da 179 aminoacidi ed è codificata da un gene (*Prnd*) localizzato sullo stesso cromosoma in cui risiede il gene codificante per la PrP^C, ad una distanza compresa fra 12 e 21 kb a seconda della specie animale in causa.** Recenti studi hanno consentito di identificare, a livello del gene *Prnd* ovino e bovino, la presenza di due

esoni (a differenza dei corrispondenti geni dell'uomo e del topo, che ne conterebbero tre), nonché di caratterizzare una serie di polimorfismi “non silenti” (in posizione 50, 110 e 132) a livello della regione codificante del gene bovino, ma non di quello ovino (in cui sono state descritte solo due sostituzioni “silenti” in posizione 12 e 26), senza che sia stata peraltro stabilita alcuna significativa associazione fra presenza dei suddetti polimorfismi, da un lato, ed accresciuta o ridotta suscettibilità alle TSE nelle due specie in oggetto, dall'altro. Alcuni studiosi hanno avanzato l'ipotesi che la proteina *doppel* (Dpl) possa esplicare, al contrario della proteina prionica (PrP^C), una funzione pro-apoptotica, teoria quest'ultima avvalorata dal dato secondo cui la proteina Dpl sarebbe in grado - qualora sintetizzata in quantità eccessive - di causare atassia locomotoria nel *topo*, inducendovi la comparsa di lesioni neurodegenerative praticamente sovrapponibili a quelle prodotte dalla *stessa* PrP^{Sc}. Ne consegue, pertanto, che una piena comprensione del legame biologico e funzionale fra i geni *Prnp* e *Prnd*, da un lato, e fra le proteine da essi codificate (PrP^C e Dpl), dall'altro, potrebbe apportare decisivi contributi alla conoscenza dei meccanismi patogenetici delle TSE. La PrP^C si trova per lo più localizzata a livello delle membrane plasmatiche, con un ancoraggio di **glicosil-fosfatidilinositolo (GPI)** in corrispondenza della sua estremità C-terminale. Un'analoga situazione è stata ipotizzata, sulla scorta di adeguati modelli di struttura molecolare, anche per la proteina Dpl. Studi assai recenti hanno inoltre dimostrato che la PrP^C, al pari di altre proteine ancorate alla superficie cellulare tramite GPI, risiede su certi “microdomini di membrana” (“*membranous microdomains*”) ricchi in colesterolo denominati “*rafts*”, interagendo fortemente, a tale livello, con componenti quali il distroglicano, l'enzima “ossido nitrico sintetasi” (“*nitric oxide synthase*”) ed il recettore per la laminina (37-kDa/67-kDa LRP/LR). Quest'ultima interazione, in particolare, può essere sia di tipo diretto, sia mediata dal legame della PrP^C con un proteoglicano (eparan-solfato-proteoglicano), che si complesserebbe a sua volta alla proteina prionica attraverso due differenti siti di legame. La proteina prionica “cellulare” (PrP^C), pur possedendo la stessa struttura primaria di quella “patologica” (PrP^{Sc}), ne differisce per la struttura secondaria (tipica delle proteine globulari, solubili in acqua, come le albumine) e terziaria. Infatti, nella PrP^C la configurazione spaziale delle catene polipeptidiche ha una struttura prevalentemente ad “**α-eliche**”, che si forma a causa dei legami di idrogeno che si stabiliscono all'interno di una singola catena e che determinano un avvolgimento a spirale delle catene polipeptidiche attorno ad un asse. Sono dunque le modificazioni post-traslazionali, con l'acquisizione di una struttura prevalentemente a “**foglietti-β**”, a conferire patogenicità alla molecola della PrP^{Sc} ed a marcare le differenze tra PrP^C e PrP^{Sc} (**Figura n. 1**). (N.B.!!!---→**RICHIAMI ALLE ALTRE FIGURE NEL TESTO???**-----→ **FIGURE nn. 2-13**). Le differenze post-traslazionali della PrP^{Sc} rispetto alla PrP^C includono una parziale resistenza alla digestione proteolitica (da cui la denominazione alternativa di PrP_{res}, contrapposta a quella di PrP_{sen}, che identifica appunto la PrP^C), la solubilità in soluzione salina e nei detergenti, la resistenza ai fattori chimico-fisici di inattivazione e la struttura secondaria e terziaria, compreso il numero degli specifici residui aminoacidici coinvolti nella disposizione spaziale delle proteine. In particolare, sarebbero i primi due domini della struttura prevalentemente ad “alfa-eliche” della PrP^C ad essere implicati nella trasformazione nella struttura prevalentemente a “foglietti-beta” della PrP^{Sc}. Il processo di conversione della PrP^C in PrP^{Sc} potrebbe esser reso ben più efficiente dalla presenza di alcune particolari proteine denominate “chaperonine”, mentre è stato recentemente documentato, in tale contesto,

l'intervento di reazioni di scambio fra il gruppo tiolico terminale della PrP^{Sc} ed il legame disolfuro intramolecolare della PrP^C.

Nelle **malattie prioniche ereditarie**, anch'esse trasmissibili, che rappresentano una percentuale compresa all'incirca fra il 5 ed il 15% delle malattie prioniche umane, a seconda delle diverse aree geografiche del Pianeta, l'origine della variante patogena della proteina prionica è attribuita ad una **mutazione puntiforme nel gene *Prnp*** (che comporta, ad esempio, l'inserimento dell'aminoacido leucina al posto dell'aminoacido prolina). Come conseguenza dell'evento mutazionale, la PrP^C diventa suscettibile, con il passare del tempo, di assumere una conformazione prevalentemente a "foglietti-beta", ossia la conformazione della proteina prionica "patologica" (PrP^{Sc}). Successivamente quest'ultima, entrando in contatto con la PrP^C, è in grado di provocarne la trasformazione in PrP^{Sc}. Prende così avvio una **reazione a catena**, in cui ogni molecola appena trasformata (PrP^{Sc}) ne trasforma un'altra normale (PrP^C) nella relativa isoforma patologica (PrP^{Sc}). Occorre in genere molto tempo affinché a livello cerebrale si accumuli un quantitativo di PrP^{Sc} sufficiente a produrre uno stato di malattia, ed è per tale motivo che il periodo d'incubazione delle TSE è assai lungo, anche di anni. Più in particolare, la PrP^{Sc}, in modo simile ad un cristallo, autocatalizza una reazione di **polimerizzazione fibrillare**, offrendo la propria struttura quale "centro di nucleazione e di stampo" e servendosi della PrP^C, che è un **precursore polipeptidico amiloideo**. Questo viene dapprima scisso per via proteolitica e quindi polimerizzato: durante la polimerizzazione il polipeptide viene modificato in una configurazione di tipo insolubile, che cristallizza e poi precipita in forma di β-fibrille di amiloide. Tale struttura costituisce il nuovo "centro di nucleazione" per un ulteriore processo di polimerizzazione, propagando così il processo con un accumulo crescente nel citosol, e raramente anche nel reticolo endoplasmatico, di amiloide fibrillare (PrP^{Sc}), fenomeno che precede la progressiva degenerazione vacuolare (da piccoli vacuoli ad un unico grande vacuolo) e la conseguente lisi delle cellule nervose. Le stesse fibrille possono essere secrete al di fuori della cellula, dando così origine alla formazione ora di **placche amiloidi extracellulari**, ora di depositi perivasali (**angiopatia amiloide cerebrale**), presenti in oltre il 50% dei casi di scrapie e soltanto nel 5% circa dei casi di BSE. Secondo alcuni Autori l'amiloide non si genererebbe nei neuroni e negli astrociti, ma nel tessuto vasale, come si evincerebbe dal fatto che nella scrapie della *pecora* depositi di amiloide non sono apprezzabili, con la colorazione al Rosso Congo (specifica per i depositi di amiloide), nelle cellule nervose e negli astrociti, che pur contengono il precursore dell'amiloide, dimostrabile immunoistochimicamente con specifici antisieri anti-PrP^{Sc}/SAF.

Per quanto concerne i **caratteri istocitopatologici** delle TSE, questi si compendiano nelle seguenti alterazioni:

1) **spongiosi della sostanza grigia cerebrale**, causata da rigonfiamento e vacuolizzazione dei neuroni (sia dei processi dendritici e assonali, sia del corpo cellulare) e, in minor misura, degli astrociti;

2) **degenerazione e perdita neuronale**;

3) **ipertrofia ed iperplasia astrocitaria (astrocitosi/astrogliosi)**;

4) **deposito intracellulare** (endoneuronale, soprattutto) **di aggregati di PrP^{Sc}**, seguito dalla deposizione e dal conseguente accumulo di PrP^{Sc} in molte aree del SNC, talvolta (a seconda del tipo di TSE in causa) pure sotto forma di placche.

La **spongiosi** si caratterizza morfologicamente come un fenomeno di **vacuolizzazione dei processi neuronali**, che comporta un'alterazione spongiforme del

neuropilo della sostanza grigia, fenomeno quest'ultimo che varia a sua volta dalla presenza di focolai disseminati ad una porosità diffusa. A tal proposito, la valutazione dell'intensità della spongiosi in una serie predeterminata di aree del SNC, attraverso l'attribuzione di uno specifico "punteggio" ("score") per ciascuna area considerata, costituisce l'indispensabile premessa per lo studio del cosiddetto "profilo lesivo" sia nell'ospite naturale, sia nell'ospite sperimentale. A sua volta, lo studio del "profilo lesivo", in particolar modo su topi con differente suscettibilità genetica nei confronti della malattia, costituisce un fondamentale strumento d'indagine ai fini della caratterizzazione dei ceppi di agente delle TSE. Attraverso un siffatto approccio, tanto imprescindibile quanto lungo ed indaginoso (i tempi di trasmissione primaria dei casi di malattia "inoculati" sono pari, in media, a 18-24 mesi), sono stati caratterizzati, fino ad oggi, circa 20 diversi ceppi di agente della scrapie, così com'è stata parimenti confermata l'assoluta identità fra il ceppo di agente responsabile della BSE e quello responsabile della vCJD, malattia recentemente descritta per la prima volta in giovani pazienti inglesi.

Lo studio del profilo immunobiochimico (*glycotyping*) dei ceppi di agente delle TSE, basato a sua volta sul riconoscimento delle differenti modalità (*patterns*) di glicosilazione della PrP^{Sc} ("glicotipi" da 1 a 4) e sebbene non così collaudato e dotato di affidabilità quanto le prove di trasmissione primaria nel topo, sembra comunque rappresentare una valida alternativa rispetto a queste ultime, anche in considerazione dei ben più rapidi tempi di risposta consentiti da un siffatto approccio.

Morfopatogenesi delle lesioni. Per quanto ancora concerne la morfopatogenesi delle lesioni osservate in corso di TSE, la PrP^{Sc} penetrerebbe nei neuroni e, in minor misura, negli astrociti, andandosi a localizzare nelle membrane delle cisterne dell'apparato di Golgi, interposte fra la sede di sintesi e le vie di secrezione delle proteine (*trans-Golgi network*). In questo compartimento membranoso intracellulare, la PrP^C, che deriva dal compartimento membranoso della superficie cellulare, interagisce con la PrP^{Sc} e così, a spese del *pool* di PrP^C, si forma PrP^{Sc} che si accumula in maniera esponenziale a livello intracellulare. Questa forma di "replicazione" dell'agente è probabilmente la causa diretta della vacuolizzazione e del rigonfiamento che si manifestano nei neuroni e, in minor misura, negli astrociti. Si è ipotizzato, a tal proposito, che la PrP^{Sc} si accumuli nei lisosomi, provocando una dispersione del loro contenuto nel citoplasma e, di conseguenza, l'alterazione vacuolare. Studi su colture cellulari farebbero ritenere che il meccanismo biochimico di questa alterazione risieda in un'attivazione diretta o indiretta del canale recettoriale per l'NMDA (N-metil-D-aspartato), che è un canale ionico per il calcio (Ca). Il conseguente aumento della concentrazione di ioni Ca²⁺ nei neuroni, con l'incremento dell'osmolarità cellulare che ne deriva, provocherebbe il rigonfiamento idropico vacuolare che è alla base dell'alterazione spongiforme. L'aumento della concentrazione endoneuronale di ioni Ca²⁺ costituirebbe altresì, secondo alcuni Autori, la base patogenetica dell'**apoptosi**, il fenomeno attraverso cui si verificherebbero, sia *in vitro* sia *in vivo*, il danno e la conseguente perdita neuronale in corso di TSE, sebbene alcuni studiosi ritengano parimenti importante, [nella genesi delle suddette alterazioni, il coinvolgimento di fenomeni di diminuita resistenza nei confronti dello "stress ossidativo" cellulare, a loro volta associati ad un'attivazione delle cellule microgliali](#) e nonostante, d'altra parte, il contributo dell'apoptosi alla degenerazione neuronale riscontrata in corso di BSE appaia oltremodo ridotto.

Oltre al SNC, che costituisce peraltro il tessuto in cui si registrano i più elevati livelli di infettività, anche gli organi ed i tessuti linfatici rappresentano, in corso di scrapie, sedi

preferenziali di accumulo sia della PrP^{Sc}, sia dell'infettività. Più in dettaglio, considerando che nella scrapie spontanea e sperimentale, così come nel corso di altre TSE animali ed umane, quali rispettivamente la CWD e la vCJD, la comparsa di infettività, nonché il deposito ed il successivo accumulo della PrP^{Sc} in alcuni distretti linfatici dell'ospite precederebbero l'insorgenza dei sintomi clinici, appare più che scontata la notevole valenza di un siffatto rilievo ai fini della **diagnosi precoce dell'infezione**. Nondimeno, i numerosi studi effettuati in questi ultimi anni sui tessuti linfatici, anche in relazione - soprattutto per quanto riguarda la specie ovina - con il genotipo dell'ospite (polimorfismi del gene *Prnp*), hanno contribuito a chiarire in maniera significativa il ruolo-chiave esplicito dal sistema linforeticolare (SLR) nella patogenesi delle TSE, ivi compreso il selettivo coinvolgimento di determinate popolazioni cellulari, quali le **cellule follicolari dendritiche** ("*follicular dendritic cells*", o FDC) ed i **linfociti B**, rispettivamente nella replicazione dell'agente della scrapie sperimentale murina in ambito splenico e nel successivo trasporto del medesimo a livello del SNC (neuroinvasione). Altre fondamentali componenti cellulari, nei cui confronti si realizzerebbe un'ancor più precoce colonizzazione ed attivazione da parte dell'agente della scrapie ovina, con contestuale formazione di depositi di PrP^{Sc}, sarebbero quindi, in ordine sequenziale, le "cellule M" ("*membranous, microvillous cells*", o "*M cells*"), i cosiddetti "macrofagi a corpo tingibile" ("*tingible body macrophages*") ed i linfociti T. Le prime cellule ("*M cells*") costituiscono parte integrante del cosiddetto "linfoepitelio", o "epitelio follicolo-associato" ("*follicle-associated epithelium*", o FAE), presente sia in ambito tonsillare, sia a livello delle placche del Peyer, strutture queste ultime che rappresenterebbero appunto, con ogni probabilità, la prima "porta d'ingresso" e la più precoce sede di replicazione utilizzate dall'agente. Accanto ai recentissimi studi che hanno consentito l'acquisizione di una serie di importanti informazioni in merito alla "cinetica" evolutivo-sequenziale dell'infezione fra le diverse popolazioni cellulari presenti a livello del SLR, ve ne sono altri, pure assai recenti, dai quali emergerebbe il ruolo-chiave parimenti svolto, in ambito patogenetico, da certe componenti "immunologicamente attive" dell'ospite, queste ultime a differenza delle precedenti di tipo "non cellulare" ed "aspecifico". Fra esse si annoverano il complesso "linfotossina-alfa/beta" ("*lymphotoxin α/β* ") con il relativo sito recettoriale per la "linfotossina-beta" ("*lymphotoxin β -receptor*"), posto sulla superficie delle cellule follicolari dendritiche (FDC), nonché il "fattore di necrosi tumorale-alfa" ("*tumour necrosis factor- α* ") e le frazioni C3 e C1_q del complemento.

Un'ulteriore, importante sede di precoce localizzazione della PrP^{Sc} in corso di scrapie ovina naturale, oltre che di CWD dei cervidi ed, assai presumibilmente, pure di FSE, complementare o alternativa rispetto al tessuto linfoide delle placche del Peyer, tonsillare ed associato alla terza palpebra, è stata recentemente identificata nei plessi nervosi (plesso mioenterico o di Auerbach e plesso sottomucoso o di Meissner) associati all'intestino (c.d. *enteric nervous system*), con una distribuzione interessante quasi tutto l'apparato gastroenterico (esofago, prestomaci, abomaso, piccolo e grosso intestino, retto) negli **ovini** contraddistinti dalla più elevata suscettibilità genetica nei confronti della scrapie.

La triade lesiva rappresentata da spongiosi, astrocitosi/astrogliosi e degenerazione/perdita neuronale (lesioni che mostrano una distribuzione simmetrica in ambito cerebrale) costituisce il fondamento su cui si basa la diagnosi delle TSE umane ed animali, che rimane tuttora, per definizione, una diagnosi *post mortem*. Un primo, essenziale orientamento diagnostico sarà comunque fornito da un accurato esame clinico-neurologico, che evidenzierà una serie di disturbi comportamentali, sensitivi, motori e del sistema

nervoso autonomo, a carattere progressivo e tipici, seppure non patognomonici, di questo gruppo di malattie. Alcuni peculiari aspetti sintomatologici verranno illustrati nei due paragrafi relativi alla scrapie ed alla BSE. Tornando ai caratteri morfologici, va sottolineato che non sono generalmente apprezzabili, in corso di TSE, lesioni macroscopiche del SNC, mentre la spongiosi cerebrale tende a presentare, come precedentemente esposto, una distribuzione ed un'intensità variabili in corso di scrapie, a testimonianza delle molteplici interazioni che si possono stabilire fra il ceppo di agente responsabile ed il genotipo dell'ospite (polimorfismi del gene *Prnp*), interazioni da cui in larghissima parte dipenderà il fenotipo di malattia di volta in volta osservato. A dispetto di ciò, il nucleo dorsale del nervo vago ed il *nucleus accumbens septi*, un piccolo nucleo telencefalico, rappresentano comunque due distretti cerebrali intensamente colpiti da lesioni spongiformi in maniera pressochè costante. In corso di BSE invece, diversamente dalla scrapie, l'unicità del ceppo di agente causale, da un lato, e la documentata assenza di polimorfismi del gene *Prnp* nella specie bovina, dall'altro, daranno origine ad un fenotipo morboso estremamente ripetitivo, quasi monotono, senza alcuna sensibile differenza fra un caso e l'altro. Qui la spongiosi risulterà particolarmente evidente a livello di determinati nuclei bulbari, quali il nucleo dorsale del vago, il nucleo del tratto solitario ed il nucleo del tratto spinale del trigemino.

La definitiva conferma diagnostica di TSE potrà comunque essere acquisita solo a seguito del riscontro in ambito cerebrale, attraverso appropriate tecniche immunoistochimiche (su materiale precedentemente fissato in formalina) o immunobiochimiche, quali il *Western blotting* (su materiale fresco o congelato), dell'**isoforma patologica della PrP^C**, ossia la **PrP^{Sc}**, specifico *marker* diagnostico di tutte le TSE.

Diagnosi precoce. Del significato - in termini di diagnosi precoce della scrapie e di altre TSE animali ed umane - relativo alla dimostrazione della PrP^{Sc} in determinati distretti linfatici prelevabili anche per via biotica, quali tonsille palatine e terza palpebra, si è già detto in precedenza. A tal proposito, nonostante gli sforzi profusi ed i risultati più che incoraggianti ottenuti sul fronte della diagnosi precoce dell'infezione, non si può ancora affermare, *tout court*, che le succitate metodiche diagnostiche godano, qualora applicate sui tessuti linfatici, di un livello di "standardizzazione" e di "validazione" ufficiale, in ambito internazionale, pari a quello raggiunto dall'ormai consolidata ed oltremodo comprovata applicazione delle medesime su tessuto cerebrale. Un problema tecnico di fondo, connesso all'utilizzo delle suddette metodiche diagnostiche, siano esse di tipo immunoistochimico o di tipo immunobiochimico (*Western blotting*), è quello relativo all'identità di sequenza aminoacidica (struttura primaria) fra PrP^C e PrP^{Sc}, che rende estremamente complessa la produzione di anticorpi (monoclonali e policlonali) in grado di distinguere l'isoforma "normale" (PrP^C) da quella "patologica" (PrP^{Sc}). Per ovviare a tale inconveniente, numerosi studi hanno affrontato il problema dei diversi pretrattamenti di tipo chimico-fisico (proteinasasi K, acido formico al 96-98%, isotiocianato di guanidina, autoclavaggio a 121°C, ecc.) che, adeguatamente applicati - da soli o in associazione - alle sezioni tissutali, sarebbero in grado di ridurre, o eliminare addirittura, la positività immunoistochimica nei confronti della PrP^C, esaltando al tempo stesso quella per la PrP^{Sc}.

Ancora in termini di diagnosi *intra-vitam*, alcuni recenti studi sembrano offrire una serie di interessanti prospettive al riguardo. Fra questi si segnalano, in particolare, quelli relativi alla dimostrazione in ambito preclinico a) di un legame selettivo e specifico della PrP^{Sc} (ma non della PrP^C) con il plasminogeno; b) di una drammatica riduzione dei livelli di

espressione del c.d. “fattore di regolazione della differenziazione eritrocitaria” (“*erythroid differentiation-related factor*”, o EDRF); c) della presenza, a livello urinario, di uno specifico “marker” diagnostico d’infezione (UPrP^{Sc}) analogo alla PrP^{Sc}, sebbene apparentemente privo di potere infettante, la cui comparsa precederebbe di gran lunga, nel criceto, l’insorgenza delle manifestazioni cliniche di malattia.

Un ulteriore, fondamentale contributo scientifico in tale direzione, che potrebbe rivelarsi utile a risolvere, almeno in parte, i difficili problemi connessi alla misurazione dell’infettività in tutte le matrici biologiche in cui questa è presente a livelli più bassi rispetto a quelli necessari ad indurre la malattia sperimentale nel topo (la specie animale universalmente impiegata a tal fine, come già in precedenza accennato), è poi quello prodotto, assai di recente, ad opera di alcuni ricercatori svizzeri, i quali hanno messo a punto un elegante protocollo di “amplificazione *in-vitro*” (da ripetersi più volte in rapida successione) di piccole quantità di PrP^{Sc} in presenza di un eccesso di PrP^C, in una reazione che si potrebbe definire una sorta di “reazione a catena della polimerasi” (“*polymerase chain reaction*”, o PCR) *sui generis*.

Come già accennato in precedenza, un’ulteriore possibilità applicabile alla diagnosi *post-mortem* delle TSE è offerta dal rilievo, in omogenati di tessuto cerebrale trattati con opportuni detergenti ed osservati al microscopio elettronico, delle SAF (*Scrapie-associated fibrils*), che rappresentano aggregati fibrillari della PrP^{Sc}. Ancora sul fronte della diagnosi *post-mortem*, un **doveroso** accenno va fatto ai cosiddetti “**test rapidi**” (quale ad esempio il test in *Western blotting* della “*Prionics*”, prodotto in Svizzera **ed ufficialmente utilizzato in Italia**), che a decorrere dal 2001 **rappresentano** i test ufficiali su cui si **basa**, nell’intero territorio dell’Unione Europea (UE), la sorveglianza “attiva” nei confronti della BSE, **attività quest’ultima che a decorrere dal 2002 viene parimenti indirizzata nei confronti della scrapie ovi-caprina**. Si tratta di 3 nuovi test diagnostici (rispettivamente messi a punto in Svizzera, in Francia ed in Irlanda) che hanno ottenuto l’approvazione ufficiale da parte dell’UE. Sono eseguibili, al pari del *Western blotting*, su materiale cerebrale fresco o congelato ed anch’essi ricercano, a tale livello, la presenza di PrP^{Sc}. In campo umano, tra i possibili esami laboratoristici per la diagnosi delle TSE, è stata proposta la ricerca nel liquido cefalo-rachidiano (LCR) delle proteine della famiglia 14-3-3 **e, in epoca assai recente, anche la ricerca della PrP^{Sc} nel LCR di pazienti affetti da CJD mediante una tecnica, oltremodo sensibile, denominata “SIFT” (“scanning for intensely fluorescent targets”)**. Gli studi sinora condotti in merito **alla proteina 14-3-3** hanno dimostrato la validità di tale tecnica a supporto del sospetto diagnostico avanzato su base clinica. In campo veterinario, l’utilizzo della metodica in oggetto su **bovini** affetti da BSE ha prodotto risultati contrastanti, mentre in una precedente indagine, effettuata su **bovini** con BSE (spontanea e sperimentale) clinicamente manifesta, la malattia era stata correlata in maniera significativa con i livelli nel LCR dell’apolipoproteina E e di altre due componenti proteiche, non meglio identificate, di peso molecolare pari rispettivamente a 35 e 36 kDa. Un ulteriore, recente studio ha dimostrato che la proteina 14-3-3 **non presenta particolare utilità diagnostica nei confronti della scrapie ovina, mentre una precedente indagine aveva documentato che la stessa** costituisce un “marker” diagnostico sensibile (95%), ma non sufficientemente specifico (69%) della scrapie, in quanto rinvenuto non solo nel LCR **di ovini** colpiti da questa patologia, ma anche in quello **di animali** affetti da encefaliti ad eziologia virale o con lesioni di natura parassitaria.

Un doveroso cenno in tale ambito merita altresì la possibilità, da ritenersi comunque allo stato attuale delle conoscenze assolutamente teorica, di formulare una diagnosi di certezza mediante **biopsia muscolare**, visti i risultati di un recentissimo studio in cui è stato appunto dimostrato che certi distretti muscolo-scheletrici (quelli degli arti posteriori, soprattutto) accumulerebbero nel **topo**, in corso d'infezione sperimentale sostenuta da alcuni ceppi di Scrapie (**Me7** e *Rocky Mountain Laboratory strains*), elevati livelli di PrP^{Sc} e di infettività.

Scrapie

La *scrapie* è una malattia neurodegenerativa cronica, a progressione inesorabilmente letale, della **pecora** e, meno comunemente, della **capra** e del **muflone**, conosciuta fin dal XVIII° secolo (1732), descritta per la prima volta in Italia nel 1977 da Cravero et al. e considerata il prototipo delle TSE.

Le prime manifestazioni cliniche della scrapie consistono generalmente in disturbi comportamentali, quali ipereccitabilità o - a seconda dei casi - stato stuporoso (c.d. *star gazing* degli Autori anglosassoni) e depressione del sensorio, cui fanno seguito, in lenta progressione, tremori muscolari, atassia locomotoria e paralisi flaccida o spastica del treno posteriore. Sebbene non patognomonico, un altro sintomo caratteristico della malattia è il grattamento (*to scrape* = grattare, sfregare) dei fianchi contro pali o pareti, con conseguente perdita della lana e comparsa di abrasioni cutanee. Altre manifestazioni cliniche, di frequente o di insolito riscontro, sono rappresentate da dimagrimento, crisi ipotoniche, aggressività, digrignamento dei denti, scialorrea e disfagia/rigurgito alimentare, sintomo quest'ultimo più comunemente associato alla scrapie della **capra**. In proposito, risulta che la variabilità clinica frequentemente osservata in corso di scrapie sia la diretta risultante delle molteplici interazioni che possono realizzarsi fra il ceppo di agente responsabile, da un lato, ed il genotipo dell'ospite, dall'altro, come già esposto in precedenza. A parziale riprova di ciò, sia pure indirettamente, si pone il fatto che in alcuni Paesi la malattia, che può avere una durata anche di alcuni mesi, viene indicata con nomi diversi, a seconda della manifestazione clinica dominante (il prurito può mancare), come ad esempio **rida** (atassia) in Islanda, **tremblante** (tremore) in Francia e **Traberkrankheit** (malattia del trotto) in Germania. La scrapie non compare di regola in animali d'età inferiore a 2 anni, manifestandosi in genere a 3-4 anni di vita, a causa del lungo stadio prodromico o periodo d'incubazione, che varia da parecchi mesi fino a 4-5 anni. Il periodo d'incubazione della malattia è influenzato, al pari del suo fenotipo clinico-patologico, dal ceppo di agente responsabile e dal genotipo dell'ospite, che attraverso i polimorfismi del gene *Prnp* (alias *Sip* e *Sinc*, come tale gene era denominato in passato, rispettivamente nella **pecora** e nel **topo**) controlla la dinamica di moltiplicazione dell'agente. **Altri fattori genetici dell'ospite potrebbero tuttavia modulare, congiuntamente al gene *Prnp*, la durata del periodo d'incubazione, come è stato assai di recente dimostrato, in corso di scrapie sperimentale murina, nel caso dei cosiddetti “multiple quantitative trait loci”, situati appunto in corrispondenza dei cromosomi 2,6,7,11 e 12 del topo.**

L'infezione generalmente avviene per via orale in tenera età, oppure per via verticale e, trascorso un periodo d'eclissi di circa 1 anno, l'agente patogeno si moltiplica nei tessuti linfatici (milza, in particolare), ma esercita effetti lesivi soltanto sul SNC, che raggiunge per via neurotrofa intra-assonale e/o per via ematogena, ad una velocità tuttavia assai inferiore a quella di virus “convenzionali” come gli *herpesvirus*. La sede di più

precoce localizzazione dell'agente della scrapie in ambito encefalico è rappresentata, con ogni probabilità, dal nucleo motore dorsale del nervo vago.

Lesioni. All'esame necroscopico gli animali mostrano variabili, seppure evidenti segni di deperimento organico, eventuali abrasioni cutanee causate dal grattamento, ma nessuna lesione macroscopica a carico del SNC, salvo (quando presente) un lieve aumento del LCR associato a modesta ectasia dei ventricoli cerebrali.

Le lesioni istologiche, variabili per intensità e distribuzione, risultano confinate al SNC e, in particolare, ai nuclei telencefalici (*nucleus accumbens septi*), ai nuclei diencefalici (ipotalamici e talamici), al corpo striato, al peduncolo, al cervelletto (corteccia e nuclei sottocorticali), al midollo allungato (nucleo dorsale del nervo vago), alla corteccia cerebrale (incostantemente) ed al midollo spinale. Tali lesioni, bilaterali e simmetriche, sono: 1) la spongiosi della sostanza grigia e, all'osservazione ultrastrutturale, anche della sostanza bianca; 2) la degenerazione e la perdita neuronale; 3) la gliosi astrocitaria (astrocitosi/astrogliosi). Dette alterazioni sono di rilevanza proporzionale al decorso della malattia. In raffronto, le lesioni osservate in corso di BSE differiscono per la sede, spingendosi più caudalmente, con un aumento della gravità della vacuolizzazione a livello dell'*obex*.

La lesione d'importanza diagnostica è la **vacuolizzazione neuronale**, che nella scrapie sperimentale compare in modo abbastanza rapido e prevalentemente nei dendriti. I caratteristici vacuoli citoplasmatici possono essere piuttosto ampi, hanno margini netti, sono unici o multipli ed eccentrici, non contengono di solito alcunchè di colorabile, salvo talvolta dei **globuli acidofili**, che rappresentano accumuli di frammenti di membrane plasmatiche in degenerazione. I neuroni vacuolizzati si rinvengono particolarmente numerosi, in genere, nella formazione reticolare e nei nuclei vestibolare mediale, cuneato laterale e papilliforme. I neuroni possono essere occasionalmente affetti da altre alterazioni regressive, quali coartazione ed iperbasofilia citoplasmatica, cromatolisi centrale e coagulazione (alterazione cellulare ischemica).

L'**astrocitosi/astrogliosi** è spesso assai pronunciata nelle zone sede di lesioni. E' considerata, in generale, una reazione secondaria, ma alcuni sono dell'opinione che sia indotta direttamente dall'agente patogeno.

La spongiosi riguarda la sostanza grigia e, come già descritto in precedenza, la sua distribuzione e la sua intensità (in corso sia di scrapie naturale, sia di scrapie sperimentale) risulterebbero direttamente correlate al ceppo di agente in causa ed al genotipo dell'ospite, nonché alla durata del periodo d'incubazione. Tali fattori sarebbero in grado di influenzare, in maniera più o meno significativa, anche l'entità della stessa astrocitosi/astrogliosi, nonché la topografia e le modalità di deposito e di successivo accumulo della PrP^{Sc} nel neuroparenchima. Al riguardo, mentre la colocalizzazione degli aggregati di PrP^{Sc} rispetto alla spongiosi appare incostante, l'astrocitosi/astrogliosi ed i depositi di PrP^{Sc} tendono di contro a presentare una distribuzione uniforme.

La **spongiosi della sostanza bianca**, trascurabile all'osservazione istologica, risulta invece evidente all'osservazione ultrastrutturale. L'alterazione spongiotica trae origine dalla dilatazione palloniforme dei dendriti neuronali e, in minor misura, dalla vacuolizzazione del pericario. Al microscopio elettronico si osservano, inoltre, fenomeni di vacuolizzazione degli assoni centrali dotati di guaina mielinica, con vacuoli che si formano sia nell'assoplasma, sia nella guaina mielinica (**edema intramielinico**). Altre alterazioni ultrastrutturali, che qualificano le lesioni in oggetto come **distrofie neuroassonali**, sono

costituite dalla presenza di formazioni “a bulbo di cipolla” composte di membrane proliferanti nel pericario neuronale, nonché di strutture tubulo-vescicolari, inglobanti mitocondri e corpi multivescicolari, negli assoni e nei dendriti. Nei prolungamenti degli astrociti si possono osservare rigonfiamenti e vacuolizzazioni, non caratteristici, che sono da alcuni considerati artefatti da fissazione non ottimale. A queste modificazioni si aggiunge incostantemente, nella scrapie sperimentale murina, e pressochè costantemente, nella scrapie sperimentale indotta nel criceto dal ceppo 263K, la presenza di depositi extracellulari di amiloide (PrP^{Sc}) sotto forma di placche (placche amiloidi), nonché di depositi perivasali di PrP^{Sc} (**angiopatia amiloide cerebrale**) nel 50% dei casi di scrapie naturale ovina.

La presenza di accumuli di PrP^{Sc} può essere dimostrata, come più sopra esposto, con appropriate tecniche immunoistochimiche (su materiale biologico precedentemente fissato in formalina) e/o immunobiochimiche (su materiale biologico fresco o congelato), quali il *Western blotting*. Tali metodiche sono in grado di evidenziare la presenza di PrP^{Sc} anche a livello dei distretti linfatici (tonsille palatine e terza palpebra, soprattutto), in cui si assisterebbe ad una più o meno precoce deposizione di PrP^{Sc}, in rapporto al genotipo dell'ospite, durante la fase preclinica della scrapie ovina, con tutte le benefiche ricadute in termini di diagnosi precoce dell'infezione di cui si è già detto in precedenza.

Nella scrapie mancano, infine, aspetti reattivi propri dell'inflammazione e, in particolare, infiltrazioni cellulari delle meningi o degli spazi perivasali.

Encefalopatia spongiforme bovina

L'encefalopatia spongiforme bovina (BSE), osservata originalmente nel Sud della Gran Bretagna nel novembre 1986 e segnalata successivamente in diversi Paesi europei, tra cui l'Italia, è una malattia neurodegenerativa cronica, ad esito costantemente mortale, che colpisce specialmente le **vacche** da latte di 3-8 anni, con un picco d'incidenza in quelle di 4-6 anni. Il periodo d'incubazione è di 3-8 anni (in media 4-5 anni) e la maggior parte degli animali contrae l'infezione ad un'età inferiore ai 2 anni.

Si ritiene che l'esposizione della popolazione bovina inglese all'agente della BSE sia databile tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, in concomitanza con la produzione, mediante trattamenti tecnologici più blandi di quelli usati in precedenza, di **farine di carne ed ossa di ruminanti** contaminate da un agente scrapie-simile (trasmissione orizzontale indiretta) presumibilmente derivato dagli **ovini**, specie in cui la scrapie è endemica nel Regno Unito.

Tuttavia, in un rapporto del Parlamento inglese pubblicato nell'Ottobre 2000 (*Report of the BSE Inquiry, UK Parliament, October 2000*), si è prospettato che la BSE abbia avuto origine, all'inizio degli anni '70, a seguito di una **mutazione spontanea** intervenuta a livello del gene della PrP di un animale di specie bovina o di altra specie, quindi, in definitiva, attraverso modalità sostanzialmente non difformi rispetto a quanto si verificherebbe in corso di CJD sporadica dell'uomo.

L'epidemia sarebbe quindi stata rinfocolata, a livelli esponenziali, dal riciclaggio in alimentazione bovina di tessuti provenienti da **bovini** BSE-infetti, attraverso modalità di contagio intraspecifico (**bovini-bovini**) di tipo *simil-cannibalistico*, non dissimili da quelle che già a suo tempo, in campo umano, avevano sostenuto la grave epidemia di **Kuru** fra gli aborigeni di **Papua-Nuova Guinea**. Infatti, la crescita dell'epidemia di BSE, che in un

decennio si ritiene abbia prodotto circa 1 milione di capi infetti (di cui **oltre 180.000** a tutt'oggi colpiti in forma clinicamente manifesta), è stata arrestata soltanto a seguito del divieto di utilizzo, a partire dal 1988, di **farine di carne ed ossa di ruminanti** per l'alimentazione del bestiame. E' stato tuttavia ipotizzato che l'infezione possa trasmettersi, seppure in maniera assai meno efficiente, anche per via materno-fetale o per contatto diretto.

L'interesse suscitato dalla comparsa dell'epidemia di BSE nella popolazione bovina inglese si è ulteriormente accresciuto a seguito della descrizione, sempre nel Regno Unito, di una serie di nuove TSE in diverse specie animali domestiche e selvatiche (vedi **Tabella 5**), nonché nell'uomo (vCJD), quale conseguenza dell'esposizione all'agente della BSE. Un elemento aggiuntivo d'interesse per tale agente, che ha dimostrato di essere in grado di superare con relativa facilità, in condizioni naturali, la cosiddetta **barriera di specie** (di cui si è già riferito in precedenza), è rappresentato dalla sua trasmissibilità, per via sperimentale, ad un ampio *range* di specie animali domestiche, selvatiche e da laboratorio. Fondati motivi di preoccupazione destano, al riguardo, la dimostrata suscettibilità dei **suini** e, soprattutto, dei **caprini** e degli **ovini** nei confronti dell'infezione sperimentalmente indotta utilizzando diverse vie di trasmissione. Nella specie ovina e caprina, in particolare, l'agente della BSE sarebbe dotato, diversamente dai **bovini** ed in maniera del tutto analoga all'agente della scrapie, di capacità replicativa nei tessuti linfatici (milza, *in primis*) dell'ospite, in cui sarebbe altresì in grado di sostenere una o più sindromi neurologiche clinicamente indistinguibili dalla scrapie. Tale evenienza, inconfutabilmente documentata in ambito sperimentale, non è stata finora dimostrata in condizioni naturali. D'altronde in Gran Bretagna l'epidemia di BSE non è stata accompagnata da un'epidemia di encefalopatia spongiforme nelle pecore.

La sintomatologia clinica costantemente osservata in corso di BSE è rappresentata da manifestazioni di apprensione e paura, leccamenti eccessivi del musello, atassia locomotoria a carico del treno posteriore, dimagrimento ed ipogalassia. Si apprezzano, inoltre, iperestesia, posizione e movimenti anomali delle orecchie, aggressività, paraparesi, ipermetria, mioclonie ed esacerbazioni temporanee dei sintomi nervosi.

Lesioni. L'esame necroscopico non evidenzia alcuna lesione significativa, mentre l'esame istologico del SNC, che in associazione con l'esame clinico-neurologico assume una notevolissima valenza diagnostica, anche in termini di diagnosi differenziale nei confronti delle altre patologie bovine del nevrasse, rivela in modo costante, ripetitivo e quasi monotono (a testimonianza dell'unicità del ceppo di agente causale) la presenza di lesioni spongiformi (spongiosi), per lo più simmetriche e prevalenti nella sostanza grigia dei nuclei del tronco encefalico, con particolare riferimento al midollo allungato ed alla protuberanza anulare. Queste possono estendersi, anteriormente, fino al mesencefalo e, posteriormente, fino al midollo spinale cervicale. Le loro localizzazioni principali sono: a) nel mesencefalo (collicoli anteriori, sostanza grigia centrale, formazione reticolare, *substantia nigra*, nucleo rosso); b) nella protuberanza anulare (nuclei vestibolari superiore, laterale e mediale, nucleo del tratto spinale del nervo trigemino, nucleo del nervo facciale, formazione reticolare); c) nel midollo allungato (nucleo del tratto solitario, nucleo dorsale del nervo vago, nucleo del tratto spinale del nervo trigemino, formazione reticolare, nucleo olivare); d) nel midollo spinale cervicale (corni dorsali e ventrali).

Le lesioni spongiformi consistono in vacuolizzazioni del neuroparenchima. Tali vacuolizzazioni si osservano sia nel pericarico dei neuroni, sia nel neuropilo della sostanza grigia dei nuclei del tronco encefalico (specialmente a livello del nucleo del tratto solitario,

del nucleo dorsale del vago, del nucleo del tratto spinale del trigemino e dei nuclei vestibolari). Più in dettaglio, le vacuolizzazioni del pericario neuronale sono essenzialmente apprezzabili nel mesencefalo, con particolare riferimento al collicolo anteriore, alla *substantia nigra* ed al nucleo rosso (sede quest'ultima in cui i fenomeni di vacuolizzazione neuronale costituiscono tuttavia un reperto piuttosto frequente anche nei **bovini** sani: 56% dei vitelloni e 16% dei bovini adulti), nonché alla formazione reticolare. Le lesioni spongiformi del neuropilo sono più numerose e più estesamente ripartite rispetto alle prime, essendo spesso le sole che si repertano nel midollo allungato. Le vacuolizzazioni neuronali sono alquanto simili a quelle osservabili in corso di scrapie, ma nella BSE le vacuolizzazioni del pericario sono più discrete o più rare. Al contrario, la **spongiosi del neuropilo**, meno frequente nella scrapie, appare costante in corso di BSE. Nella BSE è apprezzabile, inoltre, una necrosi coagulativa di singoli neuroni (necrosi solitaria), raramente accompagnata da neuronofagia. Le lesioni regressive dei neuroni si rinvengono associate, incostantemente, ad una modesta astrocitosi/astrogliosi.

L'**amiloidosi** è presente soltanto nel 5% dei casi di malattia sotto forma di placche, colorabili con il Rosso Congo, nelle quali può essere immunoistochimicamente dimostrata la presenza di PrP^{Sc}/SAF. Oltre che immunoistochimicamente, la presenza di PrP^{Sc} in ambito encefalico può essere documentata, ai fini della definitiva conferma diagnostica di BSE, anche attraverso opportune tecniche immunobiochimiche ed immunoenzimatiche, quali rispettivamente il *Western blotting* ed i cosiddetti test rapidi recentemente validati in ambito UE come già ricordato. Tali metodiche, diversamente dalle tecniche immunoistochimiche, non sono comunque eseguibili su materiale fissato in formalina, ma solo su tessuto fresco o congelato.

In omogenati di tessuto cerebrale sottoposti a trattamento con detergenti possono essere inoltre identificate, al microscopio elettronico, delle strutture fibrillari simili alle **SAF** (*Scrapie-associated fibrils*) o **prion rods**. Nei cervelli di **bovini** con BSE clinicamente conclamata, lasciati per una settimana a 37°C, è ancora possibile evidenziare le SAF nonostante l'autolisi tissutale.

Un ulteriore elemento degno di nota è quello relativo alla mancata corrispondenza osservata, in corso di BSE, fra distribuzione delle lesioni spongiformi, da un lato, e potere infettante (infettività) del tessuto nervoso, dall'altro. Infatti, mentre la spongiosi appare generalmente limitata al solo tronco encefalico, l'intero SNC risulta dotato di infettività.

Ringraziamenti

Si ringrazia il dott. Umberto Agrimi (Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Medicina Veterinaria) per aver cortesemente fornito parte della documentazione iconografica presentata. Si ringrazia inoltre il prof. Maurizio Pocchiari (Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Virologia) per aver gentilmente messo a disposizione l'anticorpo policlonale anti-PrP utilizzato (P7/7).¹

Si ringrazia il Dott. Umberto AGRIMI (Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Medicina Veterinaria) per aver cortesemente fornito parte della documentazione iconografica presentata. Si ringrazia inoltre il Prof. Maurizio POCCHIARI (Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Virologia) per aver gentilmente messo a disposizione l'anticorpo policlonale anti-PrP utilizzato (P7/7).¹

Didascalie delle figure TSE Di Guardo

1. **Figura n. 1:** Modello schematico di conversione post-traslazionale della PrP “normale” o “cellulare” (PrP^C), con prevalente struttura ad “alfa-eliche”, in PrP “patologica” (PrP^{Sc}), con prevalente struttura a “foglietti-beta”.

2. **Figura n. 2:** Criceto. Encefalo. Imponente quadro di spongiosi della sostanza grigia, accompagnato da grave degenerazione e perdita neuronale, in corso di scrapie sperimentale sostenuta dal ceppo 263K. Ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

3. **Figura n. 3:** Criceto. Encefalo. Marcata reattività astrogliale (astrocitosi/astrogliosi) in corso di scrapie sperimentale sostenuta dal ceppo 263K. Colorazione immunoperossidasi per la proteina fibrillare acida gliale (“*glial fibrillary acidic protein*”, GFAP), “marker” specifico degli astrociti. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingrandimento.

4. **Figura n. 4:** Criceto. Encefalo. Scrapie sperimentale sostenuta dal ceppo 263K. Presenza di voluminosi aggregati di PrP^{Sc}, organizzati sotto forma di placche, in sede subependimale. Colorazione immunoperossidasi per la PrP^{Sc}, previo autoclavaggio delle sezioni tissutali per 30 min. in acqua distillata. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingrandimento.

5. **Figura n. 5:** *Ovino*. Encefalo. Scrapie. Marcata spongiosi della sostanza grigia a livello del nucleo dorsale del nervo vago. Ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

6. **Figura n. 6:** *Ovino*. Encefalo. Scrapie. Evidentissima spongiosi della sostanza grigia a livello del *nucleus accumbens septi*. Ematossilina-eosina, medio ingrandimento.

7. **Figura n. 7:** *Bovini*. Encefalo. Rappresentazione schematica dei nuclei di sostanza grigia bulbare costantemente interessati da lesioni spongiformi in corso di BSE.

8. **Figura n. 8:** *Ovino*. Encefalo. Scrapie. Diffusa positività immunoistochimica per la PrP^{Sc}, con presenza di caratteristici depositi “a cielo stellato”, a livello del mesencefalo. Colorazione immunoperossidasi per la PrP^{Sc}, previo autoclavaggio delle sezioni tissutali per 30 min. in acqua distillata. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingrandimento.

9. **Figura n. 9:** *Bovini*. Encefalo. BSE. Presenza di aggregati di PrP^{Sc} di tipo “lineare” o “sinaptico”. Colorazione immunoperossidasi per la PrP^{Sc}, previo autoclavaggio delle sezioni tissutali per 30 min. in acqua distillata. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingrandimento.

10. **Figura n. 10:** “*Western blotting*” per la dimostrazione della presenza di PrP^{Sc} in omogenati di tessuto cerebrale di criceto con scrapie sperimentale sostenuta dal ceppo 263K (corsia di sinistra) e di *pecora* affetta da scrapie (corsie intermedia e di destra). Si nota il tipico “bandeggio” della PrP^{Sc}, caratterizzata appunto da un peso molecolare di 27-30 kDa (PrP 27-30). Predigestione della PrP^C con proteinasi K, colorazione con diaminobenzidina (DAB)/perossido d'idrogeno (H₂O₂).

11. **Figura n. 11:** *Ovino*. Tonsilla palatina. Scrapie. Presenza, a livello di un follicolo linfatico, di consistenti depositi di PrP^{Sc} durante la fase preclinica dell'infezione. Colorazione immunoperossidasi per la PrP^{Sc}, previo autoclavaggio delle sezioni tissutali per 30 min. in acqua distillata. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingrandimento.

12. Figura n. 12: Scrapie ovina. Gruppo di pecore di razza Sarda con malattia in atto, a diverso stadio clinico-evolutivo. E' chiaramente riconoscibile, in alcuni animali, la presenza di alterazioni comportamentali (evidente stato stuporoso, c.d. "star gazing" degli Autori anglosassoni) e sensoriali (intenso prurito a carico degli arti).

13. Figura n. 13: Rappresentazione schematica dell'epidemiologia della BSE nel Regno Unito. In proposito, una notevolissima rilevanza epidemiologica va senz'altro attribuita al **bovini** nella sua triplice veste di "selettore" in un primo momento (trasmissione interspecifica **ovino**--->**bovini**), di "amplificatore" in un secondo tempo (trasmissione intraspecifica **bovini**--->**bovini**) e di "ridistributore" in una terza fase (trasmissione interspecifica **bovini**--->altre specie animali, uomo compreso--->vCJD) del ceppo di agente responsabile dell'epidemia, che si presume sia derivato da quello della scrapie. Fondati motivi di preoccupazione desta pure, in tale ambito, la possibilità (finora dimostrata solo sperimentalmente) che l'agente della BSE "ritorni" o sia "ritornato", per così dire, alla **pecora** ed alla **capra**, inducendovi la comparsa di una o più sindromi neurologiche clinicamente indistinguibili dalla scrapie. **Una recente ipotesi alternativa prevede tuttavia che la BSE sia comparsa, all'inizio degli anni '70, a seguito di una mutazione spontanea del gene della PrP bovina o di altra specie animale.**

BIBLIOGRAFIA INTEGRATIVA

(in ordine di citazione rispetto al testo)

1. Vaccari G. et al. (2001): *PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie*. Arch. Virol. 146, 2029.
2. Agrimi U. et al. (2001): *Encefalopatie spongiformi trasmissibili degli animali e genetica*. In: Atti Tavola Rotonda 'BSE: Tra Scienza ed Emergenza', LV° Convegno Nazionale della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (S.I.S.Vet.), Rimini, 20-22. Settembre. 2001.
3. Hill A.F. et al. (2000): *Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 97, 10248.
4. Wong B.-S. et al. (2000): *Prion disease: A loss of antioxidant function?* Biochem. & Biophys. Res. Comm. 275, 249.
5. Mo H. et al. (2001): *Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 98, 2352.
6. Kuwahara C. et al. (1999): *Prions prevent neuronal cell-line death*. Nature 400, 225.
7. Tranulis M.A. et al. (2001): *The PrP-like protein Doppel gene in sheep and cattle: cDNA sequence and expression*. Mamm. Genome 12, 376.

8. Li A. et al. (2000): *Physiological expression of the gene for PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of PrP-deficient mice ataxic due to Purkinje cell degeneration.* Am. J. Pathol. 157, 1447.
9. Comincini S. et al. (2001): *Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND).* Mamm. Genome 12, 729.
10. Aguzzi A. et al. (2000): *Prions: Pathogenesis and reverse genetics.* Ann. N.Y. Acad. Sci. 920, 140.
11. Silverman G.L. et al. (2000): *Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of PRNP (0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss.* J. Biol. Chem. 275, 26834.
12. Keshet G.I. et al. (1999): *Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase.* J. Neurochem. 72, 1224.
13. Keshet G.I. et al. (2000): *The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain.* J. Neurochem. 75, 1889.
14. Gauczynski S. et al. (2001): *The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein.* EMBO J. 20, 5863.
15. Hundt C. et al. (2001): *Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor.* EMBO J. 20, 5876.
16. Prusiner S.B. (2001): *Neurodegenerative diseases and prions.* N. Engl. J. Med. 344, 1516.
17. Welker E. et al. (2001): *A role for intermolecular disulfide bonds in prion diseases?* Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 98, 4334.
18. Milhavet O. et al. (2000): *Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress.* Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 97, 13937.
19. Brown D.R. (2001): *Microglia and prion disease.* Microsc. Res. Tech. 54, 71.
20. Mabbott N.A., Bruce, M.E. (2001): *The immunobiology of TSE diseases.* J. Gen. Virol. 82, 2307.
21. Bruce M.E. et al. (2001): *Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) infectivity in extraneural tissues.* Lancet 358, 208.
22. Heggebo R. et al. (2000): *Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent.* J. Gen. Virol. 81, 2327.
23. Mabbott N.A. et al. (2000): *Tumour necrosis factor- α -deficient, but not interleukin-6-deficient, mice resist peripheral infection with scrapie.* J. Virol. 74, 3338.
24. Mabbott N.A. et al. (2001): *Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of Cl_q significantly delays onset of scrapie.* Nature Med. 7, 485.
25. Klein M.A. et al. (2001): *Complement facilitates early prion pathogenesis.* Nature Med. 7, 488.
26. Ryder S. J. et al. (2001): *Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy.* Vet. Rec. 148, 437.
27. Sigurdson C.J. et al. (2001): *PrP^{CWD} in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease.* J. Gen. Virol. 82, 2327.
28. Fischer M.B. et al. (2000): *Binding of disease-associated prion protein to plasminogen.* Nature 408, 479.
29. Miele G. et al. (2001): *A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform*

- encephalopathies*. Nature Med. 7, 361.
30. Shaked G.M. et al. (2001): *A protease-resistant prion protein isoform is present in urine of animals and humans affected with prion diseases*. J. Biol. Chem. 276, 31479.
 31. Saborio G.P. et al. (2001): *Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding*. Nature 411, 810.
 32. Di Guardo G. et al. (2001): *Il punto della situazione sulla BSE: "Test rapidi" per la diagnosi*. Argomenti S.I.Ve.M.P. 4, 17.
 33. Bieschke J. et al. (2000): *Ultra-sensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets (SIFT)*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 97, 5468.
 34. Tyler J.W. et al. (2001): *The 14-3-3 cerebrospinal fluid immunoassay lacks utility in the diagnosis of clinical scrapie*. J. Vet. Diagn. Invest. 13, 537.
 35. Lloyd S.E. et al. (2001): *Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 98, 6279.
 36. Jeffrey M. et al. (2001): *Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera*. J. Comp. Path. 124, 280.
 37. Bosque P.J. et al. (2002) : *Prions in skeletal muscle*. Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 99, 3812.