

A.I.P. Vet.

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

AIPVet

Associazione Italiana di Patologia Veterinaria

I Congresso Nazionale



con la partecipazione

della Società Italiana di Patologia Tossicologica e Sperimentale

del Gruppo di Patologia Clinica Veterinaria

del Gruppo Veterinario di Analisi di Immagine

**Palazzo Feltrinelli, Gargnano (BS),
30 Aprile - 1 Maggio 2004**

**INDAGINI ISTOLOGICHE, IMMUNOISTOCHEMICHE E
IMMUNOBIOCHIMICHE IN CAPRE CLINICAMENTE SANE PROVENIENTI DA
UN FOCOLAIO DI SCRAPIE**

Leoni Antonio, Ligios Ciriaco**, Rocca Stefano*, Madau Laura**, Pirino Salvatore*, Cancedda
Maria Giovanna**, Zucca Rosalba*, Nieddu Antonio Mario*.*

*Istituto di Patologia Generale, Anatomia Patologica e Clinica Ostetrico/Chirurgica Veterinaria, Facoltà
di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari.

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff", Sassari.

Riassunto

Nel corso del 2003, nell'ambito del piano di sorveglianza passiva sulle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSEs), per la prima volta in Sardegna, è stata diagnosticata istologicamente ed immunoistochimicamente la scrapie in una capra. Il soggetto proveniva da un gregge nel quale da 2 anni si manifestava una patologia polimorfa caratterizzata talvolta da sintomi neurologici e da una mortalità intorno al 20%. Sulla base della legge attualmente in vigore in Italia si è proceduto all'abbattimento di tutte le capre presenti in allevamento (n = 93). Durante l'abbattimento venivano prelevati da ciascun capo obex, linfonodi retrofaringei e tonsille. L'esame istologico dell'obex non evidenziava quadri lesivi di tipo spongiforme mentre l'esame immunoistochimico del tessuto nervoso e linfatico evidenziava la presenza di cinque soggetti nello stato pre-clinico della malattia.

Parole Chiave: scrapie, capra, PrP^{sc}, tonsilla.

Summary

Histological, immunohistochemical and immunobiochemical study on clinically-healthy goats from a scrapie affected flock. In 2003 the first case of scrapie in goats in Sardinia was confirmed by histological and immunohistochemical examination during the passive surveillance programme for Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs). The scrapie-affected goat came from a flock in which an undefined syndrome, characterized in some cases by neurological signs, and with a mortality rate of 20% had developed in the two previous years. In accordance with the Italian law for such cases, all goats from the affected flock were killed (n = 93). Obex, retropharyngeal lymph-nodes and

tonsils were collected from each goat. None of the goats showed any evidence of spongiform lesions in the obex. However, five preclinically affected goats were found by the immunohistochemical examination of the nervous and lymphoid tissues.

Key Words: scrapie, goat, PrP^{sc}, tonsil.

Introduzione

Nella capra la scrapie è descritta meno frequentemente che nella pecora, comunemente considerata più sensibile.

In Italia la scrapie è stata segnalata per la prima volta in Piemonte (Cravero et al. 1977) nell'ovino, mentre nella capra i primi casi sono stati accertati solo a partire dal 1997 (Caramelli et al. 1998). In Sardegna sinora la scrapie era stata evidenziata esclusivamente nelle pecore, seppure in molti dei focolai assieme alle pecore fossero allevate delle capre (Ligios et al 2003). Solo nel 2003, nel corso della sorveglianza passiva per le EST, è stato diagnosticato il primo focolaio di scrapie in un gregge di sole capre che, sulla base delle attuali norme di legge, sono state tutte abbattute.

Considerata la scarsità della bibliografia sulla scrapie caprina, abbiamo ritenuto interessante, oltrechè segnalare per la prima volta la malattia in capre della Sardegna, campionare tessuti nervosi e linfatici dai soggetti abbattuti al fine di descrivere, mediante indagini istologiche, immunoistochimiche ed immuno-biochimiche, gli aspetti fenotipici della malattia sia nei soggetti asintomatici che in quelli asintomatici-infetti.

Materiale e metodi

Sono state sottoposte a indagine le 93 capre di un gregge nel quale da circa due anni veniva osservata una patologia polimorfa caratterizzata da una mortalità del 20% ed in alcuni casi da una

sintomatologia neurologica. Su uno di questi soggetti veniva confermata la presenza della scrapie mediante esame istologico ed immunostochimico.

Di tale soggetto veniva conservato in formalina al 10% il cervello *in toto* nonché campioni di alcuni distretti linfatici (milza e linfonodo meseraico).

Da tutti gli animali abbattuti in base alle attuali disposizioni di legge venivano prelevati l'obex, le tonsille, i linfonodi retrofaringei e le terze palpebre. L'obex veniva diviso, con un taglio sagittale mediano, in due parti di cui una era fissata in formalina tamponata 10% per gli esami istologici assieme ad un linfonodo retrofaringeo, una terza palpebra ed una tonsilla. La restante parte degli stessi campioni veniva congelata a -20 °C per l'esame in western-blotting. Nessuno dei capi presentava sintomi neurologici al momento dell'abbattimento.

I campioni fissati in formalina erano inclusi in paraffina e le sezioni di 5 micron di spessore colorate con Ematossilina-Eosina secondo protocolli routinari. Per l'esame immunostochimico erano allestite delle sezioni su vetrini che venivano sparaffinate, reidratate ed infine trattate con acido formico per 30' e poste in autoclave per 30' a 121°C. Come anticorpo primario venivano utilizzati due anticorpi monoclonali (34C9 - Prionics, CH; F99 - VMRD, Inc., Pullman, USA); la reazione era poi evidenziata con un sistema ABC (*Avidina Biotina Complex - Vector*) e con 3,3'-diaminobenzidina.

Per l'esame in western-blotting è stato utilizzato il kit diagnostico *Prionics Check Western* (Prionics - CH) secondo le indicazioni tecniche della ditta produttrice.

Risultati

Nel capo con sintomatologia l'esame istologico del cervello permetteva di osservare una grave spongiosi a livello di numerosi nuclei (nuclei talamici e nucleo *accumbens*) (Figura 1). La vacuolizzazione neuronale era scarsa ed evidenziabile soprattutto in qualche neurone dei nuclei del midollo allungato. I patterns immunostochimici encefalici del medesimo soggetto erano caratterizzati dalla predominante presenza di depositi di PrP^{sc} sotto forma di fini granulazioni a livello del neuropilo dei nuclei del midollo allungato e del talamo. Altri patterns

evidenziati erano: depositi finemente granulari intraneuronali di PrP^{sc}, specie nei motoneuroni di numerosi nuclei del midollo allungato; positività perivasali, talvolta con aspetto di masse simili a placche (figura 2 A); positività sub-epindimale; sottili trame lineari nel neuropilo a livello del talamo (foto 2 B); accumuli perineuronali (figura 3 A) più evidenti a livello dei nuclei del vago e della formazione reticolare; grossolani depositi lineari disposti a raggiera, diramanti da un nucleo probabilmente di tipo gliare, maggiormente manifesti nella sostanza reticolare. L'esame immunostochimico della milza e del linfonodo meseraico mostrava depositi di PrP^{sc} nei centri germinativi di numerosi follicoli di entrambi gli organi.

Nel midollo allungato di tutti i soggetti asintomatici, prelevato al momento dell'abbattimento, non si osservavano lesioni di tipo spongiforme, mentre all'esame immunostochimico si potevano apprezzare in due soggetti depositi di PrP^{sc} a forma di "spot" in posizione intraneuronale (figura 4) e nel neuropilo di numerosi nuclei. Tali positività erano quasi assenti a livello del nucleo del vago, mentre il nucleo del trigemino risultava tra i più colpiti. Mancavano inoltre tutti gli altri patterns immunostochimici osservati nel soggetto sintomatico. Il tessuto linfatico (tonsilla, linfonodo retrofaringeo e III palpebra) di questi due soggetti era negativo all'esame immunostochimico.

Su altri tre soggetti si rilevava positività all'esame immunostochimico di tutti i distretti del SRL prelevati, ma non dell'*obex*. Anche in questi casi i depositi di PrP^{sc} erano confinati nei centri germinativi dei follicoli (Figura 3 B).

Le positività all'esame immunostochimico erano confermate, e davano quadri simili, con entrambi gli anticorpi.

L'esame in western-blotting degli organi linfatici e dell'*obex* delle 93 capre oggetto di studio dava esito negativo.

Organo	Western blotting (Positivo/Negativo)	Es. immunistoichimico (Positivo/Negativo)	Esame istologico (Positivo/Negativo)
Obex	0/93	2/93	0/93
Tonsilla	0/93	3/93	0/93
Linf. Retrofaringeo	0/93	3/93	Non eseguito
Linfatico III° palpebra	0/93	3/93	Non eseguito

Tabella 1. Distribuzione di PrP^{sc} all'esame immunistoichimico ed al western blotting nel tessuto linfatico e nervoso e presenza di lesioni spongiformi nell'obex di capre asintomatiche provenienti da un focolaio di scrapie.

N. Capra	Esame Immunistoichimico				Western blotting				E. istologico
	Organi				Organi				Organi
	Obex	Tonsilla	L. ret.far.	L. III pal.	Obex	Tonsilla	L. ret.far.	L. III° pal.	Obex
1	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	+	+	+	-	-	-	-	-
4	-	+	+	+	-	-	-	-	-
5	-	+	+	+	-	-	-	-	-

Tabella 2. Rienilogo della positività nei vari distretti

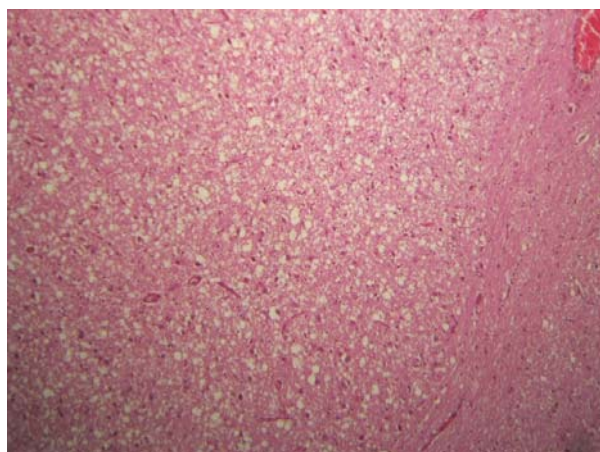


Figura 1. Capra con sintomatologia neurologica, encefalo, grave e diffusa spongiosi del nucleo *accumbens*. Ematossilina-eosina. 400 X.

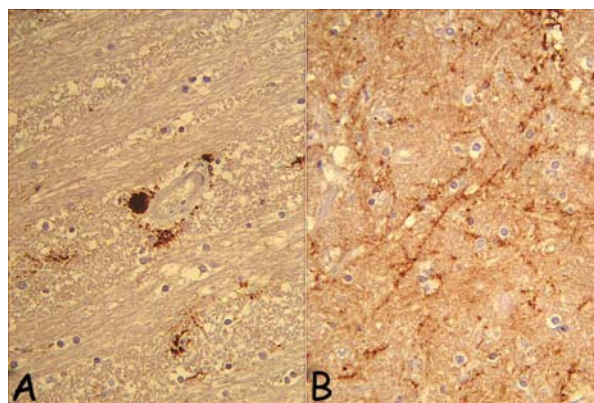


Figura 2. **A)** Capra con sintomatologia neurologica, encefalo, talamo, depositi perivasali di PrP^{sc} con aspetto simile a placche; **B)** Capra con sintomi neurologici, encefalo, talamo sottili positività lineari per PrP^{sc}, anticorpo primario F99, biotina streptavidina, 400 X

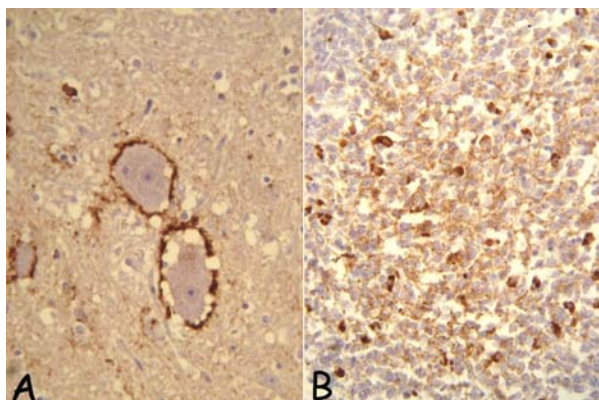


Figura 3. A) Capra con sintomi neurologici, marcata positività perineuronale per PrP^{Sc} ; B) Capra asintomatica, tonsilla, depositi di PrP^{Sc} sono presenti nel centro germinativo di un follicolo, anticorpo primario F99, biotina streptavidina. 400 X.

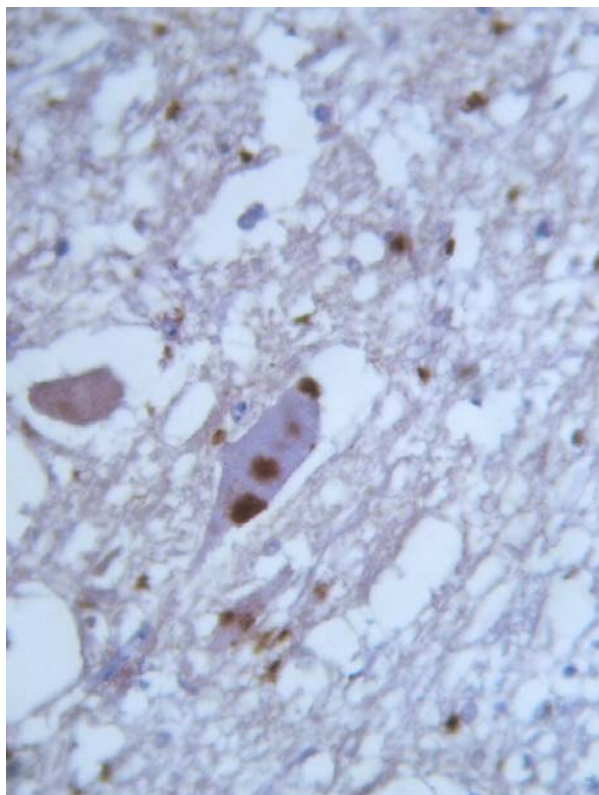


Figura 4. Capra asintomatica, cervello, obex, depositi di PrP^{Sc} sotto forma di "spot" sono presenti in posizione intraneuronale, anticorpo primario F99, biotina streptavidina. 400 X.

Discussione

I risultati del nostro studio evidenziano che, nei greggi caprini affetti da scrapie, esiste una percentuale variabile di soggetti preclinici, che nel nostro caso è stata del 5,3%. Tra questi si sono riscontrati tre capi che presentavano PrP^{Sc} in tutti i distretti del SRL esaminati, ma non nell'obex, dimostrando il coinvolgimento del sistema linfatico nella fase preclinica della malattia, così come osservato nella scrapie ovina (Schreuder et al. 1996) ed in molte altre EST. Tuttavia si è potuto rilevare come nella patogenesi della scrapie caprina talvolta non si abbia coinvolgimento del SRL (Tab 2). Tale aspetto è stato accertato anche negli ovini (Jeffrey et al., 2002) e sembra molto frequente in pecore con il genotipo ARQ/ARQ (Carta et al. 2003). In questa specie animale è stato ipotizzato che tale quadro patogenetico sia dovuto o al ceppo della scrapie implicato o al genotipo. Nella capra quest'ultima ipotesi risulterebbe meno probabile considerato che in tale specie non è stata sinora confermata una correlazione tra polimorfismi al gene della PrP e resistenza/suscettibilità alla scrapie (Billis et al. 2002).

Nella nostra indagine il wester-blotting, avendo dato esito negativo in tutti i campioni di tessuto linfatico e nervoso (compresi quelli positivi all'esame immunohistochimico), è risultato apparentemente meno sensibile. E' probabile dunque, al fine di rendere il metodo più adatto ad un utilizzo nella specie caprina, che sia necessario apportare alcune variazioni al normale protocollo di lavoro.

I patterns istolesivi osservati nel soggetto con sintomatologia sono risultati molto simili a quelli descritti nell'ovino di razza sarda con genotipo ARQ/ARQ, in particolare per quanto riguarda la gravità delle lesioni riscontrate a livello del nucleo *accumbens* (Ligios et al. 2002). I patterns immunohistochimici osservati in quest'ultimo soggetto non differiscono sostanzialmente da quanto descritto da altri autori nell'ovino (van Keulen, 1995). Al contrario nei 2 soggetti asintomatici l'aspetto morfologico del quadro immunohistochimico differisce marcatamente da quanto osservato sia nell'unica capra con sintomi clinici che negli ovini in Sardegna (Ligios et al. 2004) e nel resto dell'Europa (van Keulen, 1995). Si potrebbe dunque ipotizzare che tale differenza

sia dovuta a due diversi ceppi di scrapie. Tuttavia, per confermare questa ipotesi si rendono necessarie delle prove di caratterizzazione fenotipica del ceppo nel modello murino.

Conclusioni

Il riscontro, nel focolaio di scrapie descritto, di particolari quadri immunoistochimici non corrispondenti a quelli sinora riportati per l'ovino, sollecita la necessità di ulteriori studi volti a meglio caratterizzare la scrapie nella specie caprina.

Bibliografia

1. Caramelli M., Canalone C., Eleni C., Di Guardo G., Pretella A., Troiano P., Agrimi U., Busani L., e Pocchiari M. (1998) Comparison of neuropathological findings and PrP_{res} immunolocalization in sheep and goat scrapie. Proceedings of 16th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Lillehammer, Norvegia.
2. Carta P., Ru G., Melis P., Vargiu M.P., Delogu A., Ligios C. (2003) Atti VII Convegno degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sulle Encefalopatie Spongiformi Animali. Supplemento del Progresso Veterinario 3, 15 Marzo 2004.
3. Cravero G., Guarda F., Dotta U., Guglielmino R. (1977). La scrapie in pecore di razza biellese. Prima segnalazione in Italia. La Clinica Veterinaria, 100, 1-14.
4. Billis C., Panagiotidis C. H., Vassilios P., Stamatis A., Nicolau A., Sotirios L., Papadopoulos O., Sklaviadis Th. (2002) Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *Journal of General Virology*, 83, 713-721.
5. Ligios C., Jeffrey, M., Ryder, S.J., Bellworthy, S.J. and Simmons, M.M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *Journal Comparative Pathology*, 127, 45-57.
6. Ligios C., Viglietti A, Carta P., Dexter G., Agrimi U, Simmons M.M. (2004) Clinicopathological findings in sheep from Sardinia showing neurological signs of disease. *The Veterinary Record* 154, 365-370.
7. Jeffrey M., Begara-McGorum I., Clark S., Martin S., Clark J., Chaplin M., Gonzalez L. 2002. Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *Journal Comparative Pathology* 127, 264-273.
8. Schreuder, B.E., van Keulen, L.J., Vromans, M.E., Langeveld, J.P. & Smits, M.A. 1996. Preclinical test for prion diseases. *Nature* 381, 563.
9. Valdez R. A., Rock M.J., Anderson A. K., O'Rourke K.I. (2003) Immunohistochemical detection of prion protein in a goat with natural scrapie. *J Vet Diagn Invest*, 15, 157-162.
10. Van Keulen, L. J. M., Schreuder, B. E. C., Meloen, R. H., Poelen-van den Berg, M., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E. W. and Langeveld, J. P. M. (1995). Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Veterinary Pathology*, 32, 299-308.