

# CARATTERIZZAZIONE DEL PROFILO ISTOLESIVO ED IMMUNOLocalIZZAZIONE DELLA PrP<sub>Sc</sub> IN CASI NATURALI DI SCRAPIE OVINA.

**AGRIMI U.\*, DI GUARDO G.°, ELENi C.°, MARCON S.\*,  
DI BARI M.A.\*, LIGIOS C.#, FAZZI P.\*, CARDONE F.\*\*,  
POCCHIARI M.\*\*.**

*Istituto Superiore di Sanità, (\*) Laboratorio di Medicina Veterinaria e  
(\*\*) Laboratorio di Virologia, viale Regina Elena 299 - 00161 ROMA.  
(°) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, via  
Appia Nuova 1411 - 00178 ROMA.  
(#) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffì", via  
Duca degli Abruzzi 8 - 07100 SASSARI.*

## **RIASSUNTO**

Gli Autori descrivono i quadri istopatologici e l'immunolocalizzazione della GFAP e della PrP<sub>Sc</sub> in 25 aree del SNC di 8 ovini con scrapie naturale, provenienti da due allevamenti della Sardegna.

Il profilo lesivo appariva sostanzialmente omogeneo fra i due gruppi di animali. In proposito, reperti di marcata spongiosi erano evidenti soprattutto a carico delle porzioni sottocorticali del telencefalo (setto, nucleo caudato) e del diencefalo (talamo, ipotalamo, corpi mammillari), mentre la vacuolizzazione neuronale era localizzata pressochè esclusivamente nei nuclei del mesencefalo e del midollo allungato.

L'astrocitosi, presente in tutti i casi esaminati, si apprezzava particolarmente a livello di setto, talamo, mesencefalo e midollo spinale.

Immunoistochimicamente, la presenza di PrP<sub>Sc</sub>, sotto forma di fini granulazioni o di inclusioni tondeggianti in sede citoplasmatica, risultava evidente soprattutto a carico dei neuroni di mesencefalo, ponte e midollo allungato. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> erano pure localizzati tra i fasci di fibre della sostanza bianca del tronco encefalico. Nelle stesse sedi anatomiche si osservavano elementi cellulari, GFAP-negativi, all'interno dei quali era presente un piccolo nucleo centrale ipercromatico da cui si dipartivano processi, PrP<sub>Sc</sub>-positivi, disposti a raggiera. Positività citoplasmatica era apprezzabile anche a livello di alcuni astrociti. Depositi marcati di PrP<sub>Sc</sub> erano presenti attorno ai vasi, specialmente quelli della sostanza bianca, nonchè in sede subependimale e subpiaie.

Il quadro clinico e lesivo sostanzialmente omogeneo portano a supporre una identità del ceppo, o dei ceppi coinvolti nei due focolai di malattia.

**Parole chiave:** scrapie, ovino, PrP<sub>Sc</sub>, immunoistochimica.

## **INTRODUZIONE**

La scrapie della pecora e della capra appartiene al gruppo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) o malattie da prioni (1). Queste sono causate da agenti la cui natura non è stata ancora definitivamente chiarita e sono caratterizzate dall'accumulo, in sede cerebrale, della isoforma alterata, denominata PrP<sub>Sc</sub> (da "scrapie"), di una sialoglicoproteina cellulare indicata come PrP<sub>C</sub> (da "cellulare") (1).

Tra le EST, la scrapie rappresenta la patologia più studiata sia in condizioni sperimentali che naturali. Le ricerche su questa malattia hanno contribuito in maniera determinante alla comprensione della patogenesi, dell'epidemiologia e dei meccanismi di trasmissione di questo gruppo di malattie ed hanno condotto, più di 30 anni fa, alla fondamentale scoperta dell'esistenza di differenti ceppi di agente della scrapie (2). Da allora sono stati identificati, in base alle caratteristiche cliniche e patologiche della malattia trasmessa su linee murine inbred, circa 20 diversi ceppi (3). I risultati di tali ricerche, difficilmente spiegabili senza ipotizzare il possesso, da parte dell'agente, di un acido nucleico, hanno avuto importanti implicazioni negli studi di eziopatogenesi delle EST e rappresentano uno dei maggiori ostacoli interpretativi della teoria prionica, che sostiene la natura esclusivamente proteica dell'agente delle EST (4).

Lo studio dei ceppi negli animali da laboratorio ha però portato a trascurare le indagini sul significato biologico della loro esistenza e sulle possibili implicazioni di questi nell'epidemiologia e nella patogenesi dell'infezione naturale. Sebbene non siano mai stati condotti studi specifici in tal senso, è facile però ipotizzare che le differenti manifestazioni cliniche e patologiche segnalate nei diversi focolai di scrapie naturale non siano occasionali ma legate al particolare ceppo di scrapie in causa ed alle caratteristiche della popolazione ovina ospite (5). Anche lo studio del quadro lesivo cerebrale si è sempre limitato alla descrizione di singoli casi di malattia e non sono mai stati condotti studi comparativi su soggetti provenienti da differenti focolai di infezione. Tali carenze derivano in gran parte dalle numerose ed imprevedibili variabili relative sia all'ospite che al ceppo di agente in causa, le quali rendono complessi l'interpretazione e il confronto dei quadri clinici e lesivi osservati in casi di scrapie naturale (6). Ciononostante, l'identificazione dei ceppi coinvolti in focolai naturali di malattia rappresenta un aspetto di indiscutibile interesse. Pertanto, nel tentativo di colmare le lacune conoscitive relative alle caratteristiche della malattia e dei ceppi responsabili dell'infezione nel nostro Paese, abbiamo ritenuto utile avviare, parallelamente alla trasmissione e caratterizzazione di ceppi su topi da laboratorio, lo studio della malattia anche nell'ospite naturale.

Nel presente lavoro vengono descritti e discussi i reperti istopatologici ed immunoistochimici osservati, in sede cerebrale, in alcuni casi naturali di scrapie ovina.

## **MATERIALI E METODI**

Gli 8 animali oggetto del presente studio provenivano da due allevamenti situati nel nord della Sardegna (7). Sette soggetti, d'età compresa tra i 22 e i 36 mesi, erano originari del primo allevamento, mentre l'ottavo animale, di 24 mesi d'età, proveniva dalla seconda azienda.

Tutti gli animali, nello stadio terminale della malattia, sono stati sacrificati e sottoposti ad autopsia nel corso della quale si è proceduto al prelievo ed alla fissazione in formalina neutra al 10% dell'encefalo. In 4 casi quest'ultimo è stato fissato *in toto*, nei rimanenti 4 la fissazione ha interessato la porzione maggiore dell'organo risultante da un taglio operato lungo la linea sagittale paramediana a partire dai lobi frontali fino al midollo allungato. La rimanente porzione di tessuto cerebrale è stata congelata subito dopo il prelievo e successivamente impiegata per la conferma diagnostica mediante western-blot. Da 5 soggetti è stato inoltre prelevato e fissato in formalina il segmento C1-C2 del midollo spinale.

Porzioni coronali interessanti i vari distretti del sistema nervoso centrale (SNC) sono state incluse in paraffina, sezionate ad uno spessore di 7  $\mu$  e colorate con ematossilina-eosina, con una metodica combinata luxol fast blue-cresyl violetto e con tecniche immunoistochimiche biotina-streptavidina-perossidasi per la dimostrazione della proteina acida gliofibrillare (GFAP) e della PrP<sub>Sc</sub>. Ai fini della immunolocalizzazione rispettivamente della GFAP e della PrP<sub>Sc</sub>, le sezioni sono state sottoposte ad un pretrattamento con pronase XIV (Sigma) allo 0,5% per 7 min a 37°C, ovvero immerse in acqua distillata ed autoclavate a 121°C per 30 min (8).

Per lo studio del profilo lesivo ci siamo riferiti, nella scelta delle aree cerebrali da esaminare, a quanto pubblicato sulla scrapie della capra (9) e sulla chronic wasting disease dei cervidi (10). In base all'entità del quadro lesivo, è stato attribuito ad ogni area un punteggio da 0 a 5, secondo i criteri utilizzati per la caratterizzazione del profilo lesivo sul topo (11).

Nel presente lavoro vengono riportati i risultati derivanti dallo studio di 25 aree rappresentative del SNC.

## RISULTATI

I risultati relativi ai quadri istopatologici osservati nei casi di scrapie oggetto del presente lavoro sono riportati nei grafici 1, 2 e 3.

Il profilo lesivo, relativamente alla spongiosi ed alla vacuolizzazione neuronale, appariva omogeneo. La prima interessava soprattutto le porzioni sottocorticali del telencefalo (setto, nucleo caudato) ed il diencefalo (talamo, ipotalamo, corpi mammillari), la seconda era localizzata pressochè esclusivamente nei nuclei del mesencefalo e del midollo allungato.

Sebbene con variazioni individuali maggiori rispetto alla vacuolizzazione, in tutti i casi esaminati era presente astrocitosi, senza che peraltro si potesse apprezzare con chiarezza una correlazione tra i due diversi aspetti lesivi.

Immunoistochimicamente, la presenza di PrP<sub>Sc</sub> risultava evidente soprattutto a livello di mesencefalo, ponte e midollo allungato. In tali sedi la positività immunoistochimica si presentava sotto forma di fini granulazioni o, più raramente, di singole o multiple inclusioni tondeggianti, occupanti il citoplasma dei neuroni. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> particolarmente marcati erano presenti tra i fasci di fibre della sostanza bianca del tronco encefalico. Alcuni assoni apparivano talvolta positivi per gran parte della loro lunghezza. Sempre nelle stesse sedi anatomiche erano poi osservabili elementi cellulari, GFAP-negativi, caratterizzati dalla presenza di un piccolo nucleo centrale ipercromatico dal quale si

dipartivano processi, PrP<sub>Sc</sub>-positivi, disposti a raggiera. Positività citoplasmatica era apprezzabile anche a livello di alcuni astrociti. Depositi marcati di PrP<sub>Sc</sub> erano presenti, pressochè in tutte le aree considerate, attorno ai vasi, e specialmente a quelli della sostanza bianca. Depositi di PrP<sub>Sc</sub> erano infine osservabili in sede subependimale ed, in minor misura, subpiaie.

## DISCUSSIONE

Nei casi di scrapie oggetto del presente studio, la vacuolizzazione dei neuroni del tronco encefalico, universalmente considerata l'aspetto lesivo più caratteristico della malattia (6,12), era accompagnata, nei distretti anteriori dell'encefalo, da una marcata spongiosi del neuropilo. Questa, secondo Fraser, risulterebbe poco evidente nella scrapie ovina naturale e particolarmente intensa, invece, in quella sperimentale (6). Nonostante ciò, la spongiosi, nei nostri casi, osservata a livello di aree generalmente poco colpite e scarsamente considerate ai fini diagnostici, come quelle diencefaliche e sottocorticali del telencefalo, costituiva l'alterazione neuropatologica di maggiore entità. In particolare, il *nucleus accumbens septi* risultava, nella totalità dei soggetti esaminati, il distretto cerebrale più gravemente leso.

Limitatamente alle aree appena indicate, la gravità e la distribuzione della spongiosi apparivano simili a quelle descritte nella scrapie della capra (9,13).

In pecore di razza Suffolk, Hadlow et al. (12), analogamente a quanto osservato nei casi da noi studiati, hanno descritto una marcata spongiosi a livello talamico, riportando però, tra le aree più colpite, anche la corteccia cerebellare, mantenuta sostanzialmente integra nei nostri casi.

Per quanto riguarda il nostro Paese, nei casi descritti da Cravero et al. (14), le differenze più significative consistevano nella costante assenza di lesioni a livello dei gangli della base e nel raro coinvolgimento dei nuclei talamici e del corpo mammillare. Ulteriori differenze riguardavano l'interessamento, sia pur infrequente, della corteccia cerebellare e, inversamente rispetto a quanto osservato da noi, il maggior coinvolgimento delle corna ventrali del midollo spinale rispetto alle dorsali.

Le alterazioni neuropatologiche, come costantemente riportato nei casi di scrapie naturale (6), presentavano, anche negli animali oggetto del presente lavoro, una distribuzione simmetrica.

Riguardo alla localizzazione immunoistochimica della PrP<sub>Sc</sub>, appare interessante osservare come questa fosse apprezzabile soprattutto nei distretti posteriori del tronco encefalico. Particolarmente diffusa e marcata era la localizzazione della proteina nelle aree di sostanza bianca. La PrP<sub>Sc</sub>, inoltre, pur essendo sempre presente nelle aree colpite da spongiosi, era evidenziabile anche in sedi apparentemente indenni. A tale proposito, occorre sottolineare che a livello di corteccia, distretto cerebrale pressochè risparmiato dalla spongiosi, gli unici accumuli significativi di PrP<sub>Sc</sub> si osservavano attorno ai vasi e, quasi esclusivamente, attorno a quelli della sostanza bianca. L'osservazione della presenza di PrP<sub>Sc</sub> in aree apparentemente non interessate da processi lesivi, la frequente localizzazione della proteina in sede perivasale e subependimale ed i marcati depositi di questa osservabili nella sostanza bianca, consentono di

ipotizzare, oltre ad una localizzazione intracerebrale dell'agente a seguito di diffusione ematogena, che la PrP<sub>Sc</sub>, una volta prodotta dalle cellule nervose, possa essere trasportata, attraverso meccanismi sconosciuti, in aree encefaliche diverse rispetto a quelle della sua sintesi. Occorre comunque considerare che, nella sostanza bianca e nelle aree perivasali e subependimali, era apprezzabile, contestualmente a quella per la PrP<sub>Sc</sub>, una forte positività immunostochimica nei confronti della GFAP. Questo porta a considerare con attenzione anche l'eventualità di un legame patogenetico tra astrociti e PrP<sub>Sc</sub>. D'altra parte, la sintesi di PrP<sub>C</sub> e del suo RNAm, nonché l'accumulo della isoforma patologica all'interno degli astrociti, sono tutti eventi patogenetici documentati in corso di scrapie (15); al riguardo, anche nei casi da noi studiati la positività immunostochimica delle differenti cellule nervose nei confronti della PrP<sub>Sc</sub> non si limitava ai soli neuroni. Ulteriori studi volti ad indagare il ruolo delle diverse popolazioni cellulari del SNC nella sintesi e "processazione" della PrP<sub>Sc</sub> nonché a chiarire i meccanismi della diffusione ed eventualmente del trasporto della PrP<sub>Sc</sub> nel SNC, contribuirebbero a svelare importanti aspetti ancora oscuri della patogenesi di tali infezioni.

Riteniamo che lo studio del quadro lesivo in casi di scrapie naturale possa fornire interessanti indicazioni, a condizione, ovviamente, di essere in possesso di sufficienti dati anamnestici sull'ospite. Gli 8 casi da noi studiati, tutti insorti in pecore di razza particolarmente selezionata, come quella sarda, e provenienti da due allevamenti situati a poche decine di chilometri l'uno dall'altro, mostravano un quadro clinico e lesivo sostanzialmente omogeneo, analogamente a quanto si verifica nella scrapie sperimentale indotta su topi inbred con ceppi clonati di agente. Tale osservazione consentirebbe di ipotizzare una identità del ceppo, o dei ceppi di agente coinvolti nei due focolai di malattia, così come della via di infezione, elemento anch'esso condizionante, come dimostrato su modelli murini, le caratteristiche del profilo lesivo (6).

Tra i dati anamnestici relativi all'ospite, riteniamo infine essenziale acquisire informazioni sulle caratteristiche genetiche dei soggetti colpiti. E' noto infatti che nella pecora, a livello del gene che codifica per la PrP<sub>C</sub>, esistono alcuni polimorfismi in grado di condizionare la comparsa e il fenotipo della malattia (16).

Alla luce dell'importanza che ha assunto di recente tale gruppo di malattie, unitamente alla necessità che all'obbligo di denuncia attualmente prescritto dal vigente Regolamento di Polizia Veterinaria, facciano seguito interventi gestionali corretti, riteniamo che la forte carenza di dati sulla scrapie nel nostro Paese necessiti di essere colmata. In particolare, accanto alle informazioni di carattere epidemiologico, occorrono studi più approfonditi sulla patologia e sulla patogenesi della malattia naturale nonché sulle caratteristiche dei ceppi responsabili dell'infezione, da un lato, e sul genotipo dell'ospite naturale, dall'altro.

## CHARACTERIZATION OF THE HISTOPATHOLOGICAL PROFILE AND PrP<sup>Sc</sup> IMMUNOLocalIZATION IN NATURALLY OCCURRING CASES OF SCRAPIE IN SHEEP.

### Summary

The Authors describe the histomorphological pattern and GFAP- and PrP<sup>Sc</sup> immunolocalization in 25 CNS areas of 8 sheep with natural scrapie, which were originary from two herds in Northern Sardinia.

The histopathological pattern was very similar between the two animal groups. A marked spongiosis was found in subcortical areas (septum, nucleus caudatus) and in the diencephalon (thalamus, hypothalamus, mammillary bodies), while neuronal vacuolation was evident in the mesencephalon and medulla oblongata nuclei.

Astrocytosis was observed in all cases, particularly in the septum, thalamus, mesencephalon and medulla oblongata.

Immunohistochemically, PrP<sup>Sc</sup>, was detected both as cytoplasmatic fine granulations and as roundish inclusions, in the mesencephalon, pons and medulla oblongata neurons. PrP<sup>Sc</sup> was also immunolocalized among bundles of white matter fibers, in the brain stem. Unidentified, GFAP-negative cells, with a small central hyperchromatic nucleus, surrounded by PrP<sup>Sc</sup>-positive radiating branches, were observed in the same anatomic locations. A marked PrP<sup>Sc</sup>-immunoreactivity was also detected around blood vessels, with special reference to those of the white matter, as well as of subependimal and subpial districts.

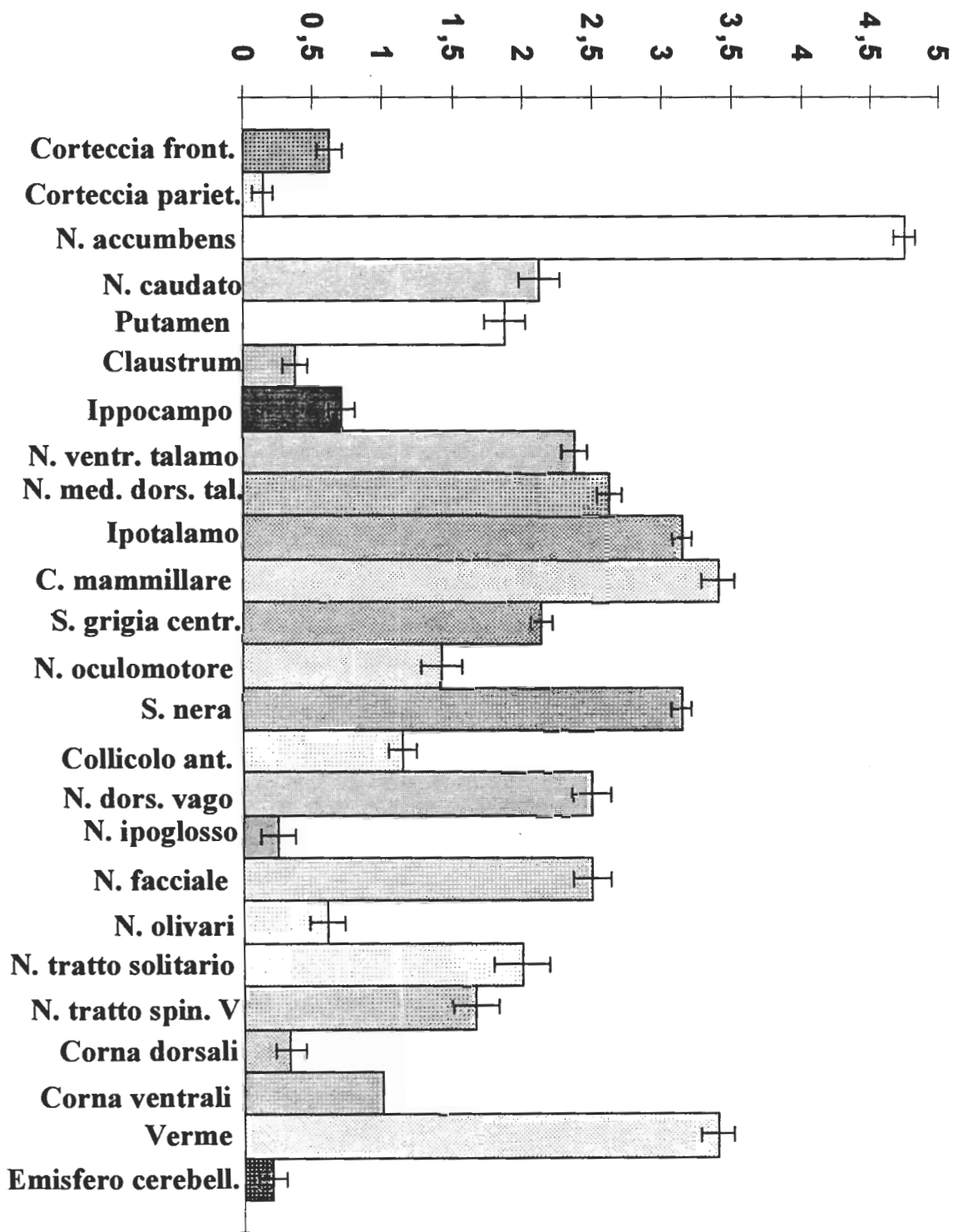
In conclusion, the clinical and pathological findings let us hypothesize the existence of one or more identical scrapie strains responsible for the two disease outbreaks.

**Key words:** scrapie, sheep, PrP<sup>Sc</sup>, immunohistochemistry.

### BIBLIOGRAFIA

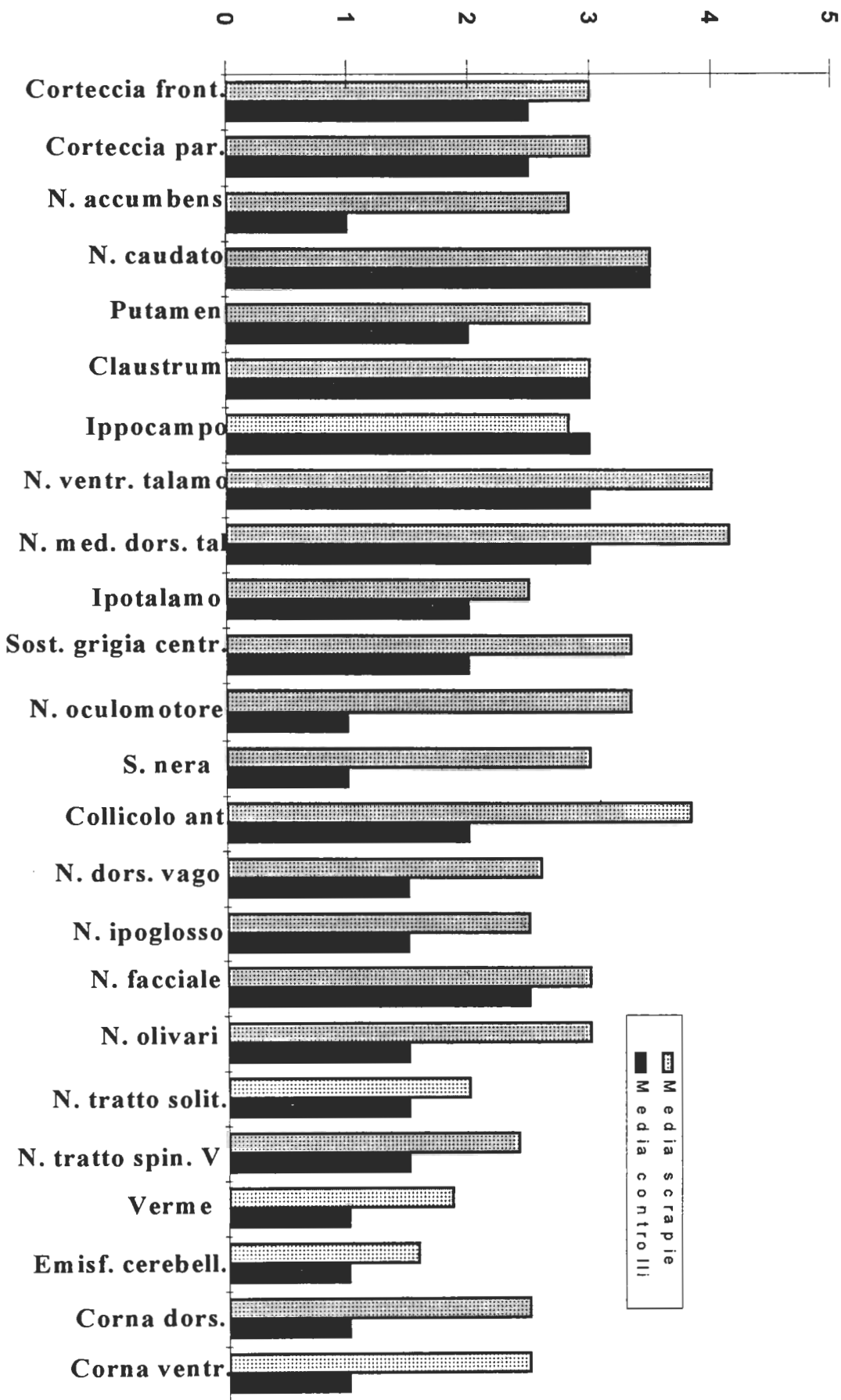
1. Pocchiari M. (1994). Prions and related neurological diseases. *Molec. Aspects. Med.* 15:195-291.
2. Pattison I.H., Millson G.C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Pathol.* 71:101-108.
3. Bruce M.E., Fraser H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172:125-138.
4. Prusiner S. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144.
5. Detwiler L.A. (1992). Scrapie. In: Transmissible spongiform encephalopathies of animals. Rev. Sci. Tech. Office International des Epizooties vol. 11 pp. 491-537.
6. Fraser H. (1976). The pathology of natural and experimental scrapie. In Slow Virus Diseases of Animals and Man (R.H. Kimberlin, ed.). North-Holland, Amsterdam, 267-305.
7. Ligios C., Depalmas S., Agrimi U., Di Guardo G., Eleni C., Bitti G., Cardone F., Pocchiari M. Prima segnalazione di scrapie in Sardegna: rilievi clinici, epidemiologici e patologici. Atti Fe. Me. S. P. Rum. (1996) (in corso di stampa).

8. Haritani M., Spencer Y.I., Wells G.A.H. (1994). Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol.* 87:86-90.
9. Hadlow W.J. (1961). The pathology of experimental scrapie in the dairy goat. *Res. vet. Sci.* 2:289-318.
10. Williams E.S., Young S. (1993). Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Vet. Pathol.* 30:36-45.
11. Fraser H., Dickinson A.G. (1968). The sequential development of brain lesions of scrapie in three strains of mice. *J. Comp. Pathol.* 78:301-311.
12. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E. (1982). Natural infection of Suffolk Sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.* 146:657-664.
13. Hadlow W.J., Kennedy R.C., Race R.E., Eklund M. (1980). Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. *Vet. Pathol.* 17: 187-199.
14. 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.
15. Georgsson G., Gísladóttir E., Àrnadóttir S. (1993). Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J. Comp. Path.* 108:229-240.
16. Laplanche J.L., Chatelain J., Westaway D., Thomas S., Dussaucy M., Brugere-Picoux J., Launay J.M. (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15:30-37.

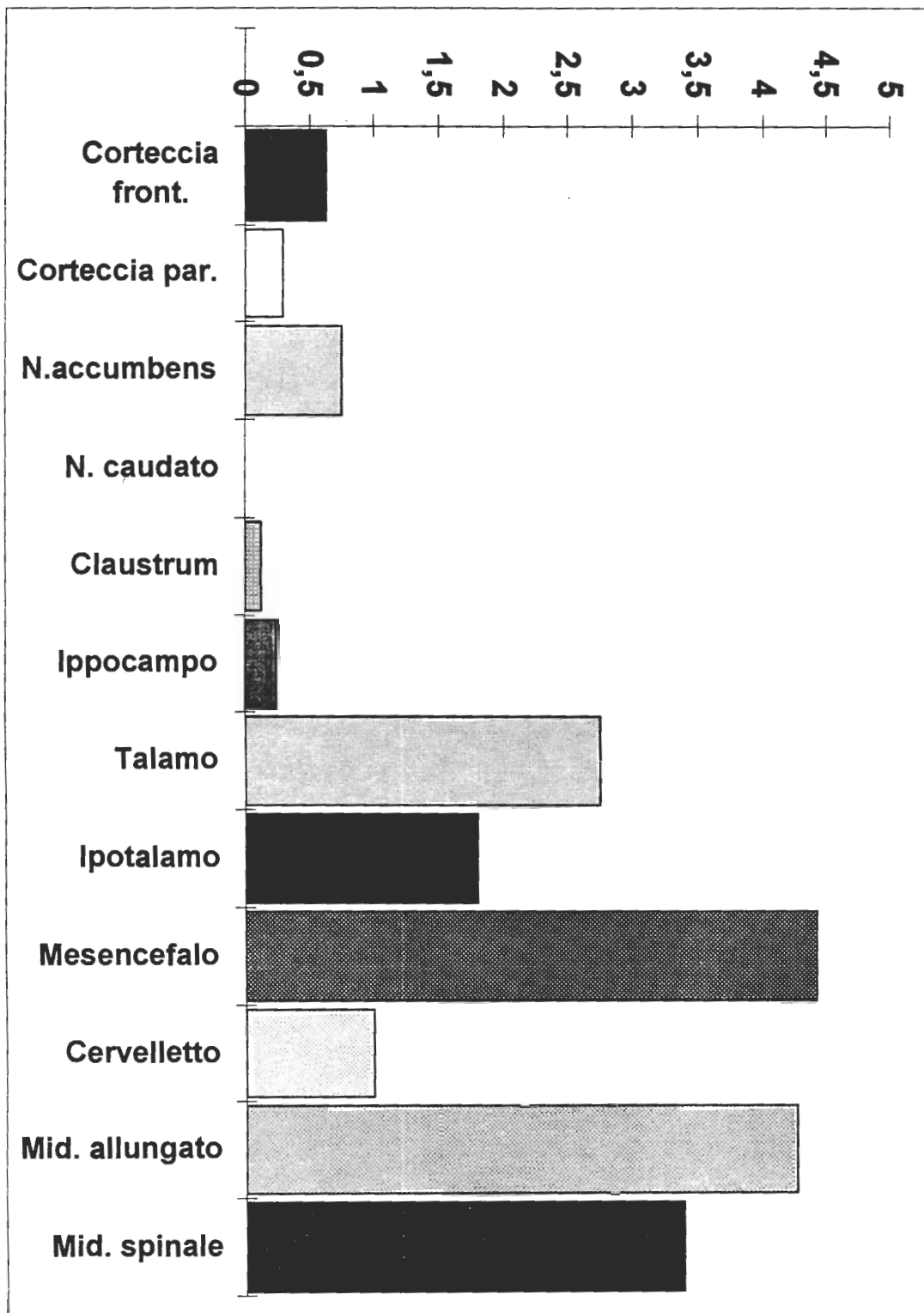


**Fig. 1.** Valori medi attribuiti alla spongiosi ed alla vacuolizzazione neuronale di 25 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina .





**Fig.2.** Valori medi attribuiti alla immunoreattività nei confronti della GFAP di 25 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina.



**Fig. 3.** Valori medi attribuiti alla immunoreattività nei confronti della PrP<sub>sc</sub> di 12 aree del SNC in otto casi di scrapie ovina.