

# CARATTERIZZAZIONE DEL “PROFILO ISTOLESIVO” NEL MIDOLLO SPINALE DI OVINI CON SCRAPIE NATURALE

C. Ligios, E. Bozzetta\*, D. Sardo, C. Casalone\*, G. Di Guardo°, U. Agrimi °°, C. Arru, M. Caramelli.\*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna “G. Pegreffi”, Sassari.

\*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta, Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali, Torino.

° Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma.

°° Istituto Superiore di Sanità – Laboratorio di Medicina Veterinaria, Roma.

## INTRODUZIONE

La scrapie è una malattia della pecora, della capra e del muflone compresa nel gruppo delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST).

Il quadro istopatologico, strettamente confinato al sistema nervoso centrale (SNC), è caratterizzato dalla formazione di vacuoli nel pericario neuronale e nel neuropilo, nonché da astrocitosi ed astrogliosi. Nella scrapie ovina naturale l’entità della vacuolizzazione (spongiosi) e la relativa distribuzione in specifiche aree dell’encefalo presentano, in molti casi, delle differenze legate alla razza (1) e all’età dei soggetti malati (2). In topi “inbred” sperimentalmente infettati con l’agente della scrapie, l’intensità e distribuzione della spongiosi espressa sotto forma di “profilo istolesivo” hanno già consentito di ipotizzare l’esistenza di diversi ceppi di agente della scrapie (3, 4) nonché di differenziare fenotipicamente le varie EST (5).

Nonostante le notevoli difficoltà interpretative esistenti in materia, alcuni Autori ritengono che dallo studio dei profili istolesivi si possono ottenere indicazioni utili anche per la conoscenza della patogenesi di questa malattia (2, 5).

Solo raramente, nell’ambito della caratterizzazione dei profili istolesivi in casi di scrapie naturale, è stato dettagliatamente valutato il midollo spinale nonostante si ritenga che quest’organo abbia una notevole importanza nella patogenesi della malattia. Infatti, esperimenti nel topo hanno dimostrato che una delle vie percorse dall’agente della scrapie, per raggiungere il cervello, è rappresentata dal midollo spinale (6, 7). In considerazione di ciò riteniamo utile lo studio “quantitativo” e della topografia delle lesioni spongiformi nel midollo spinale di ovini con scrapie.

## MATERIALE E METODI

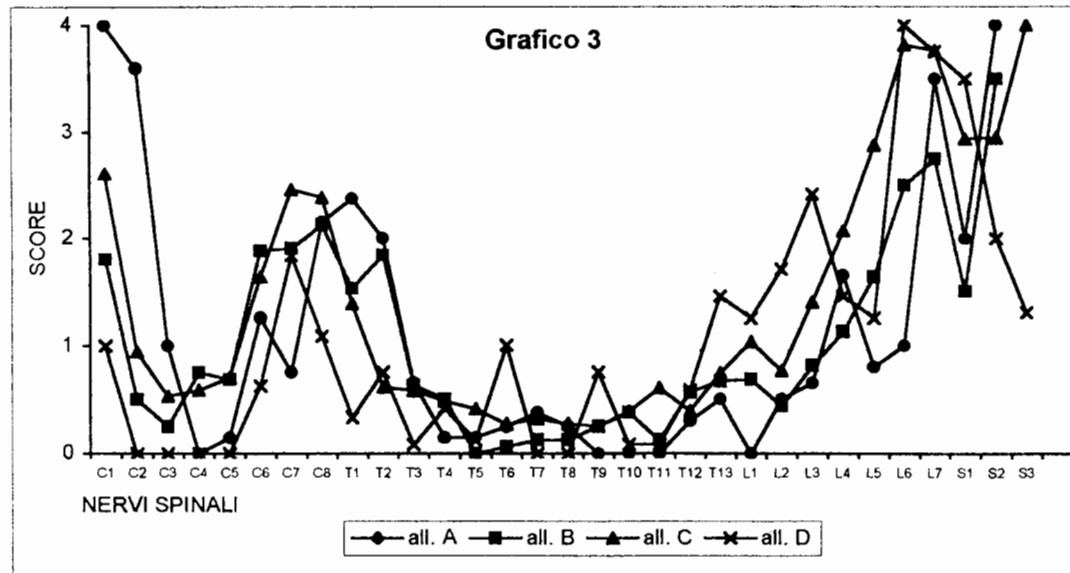
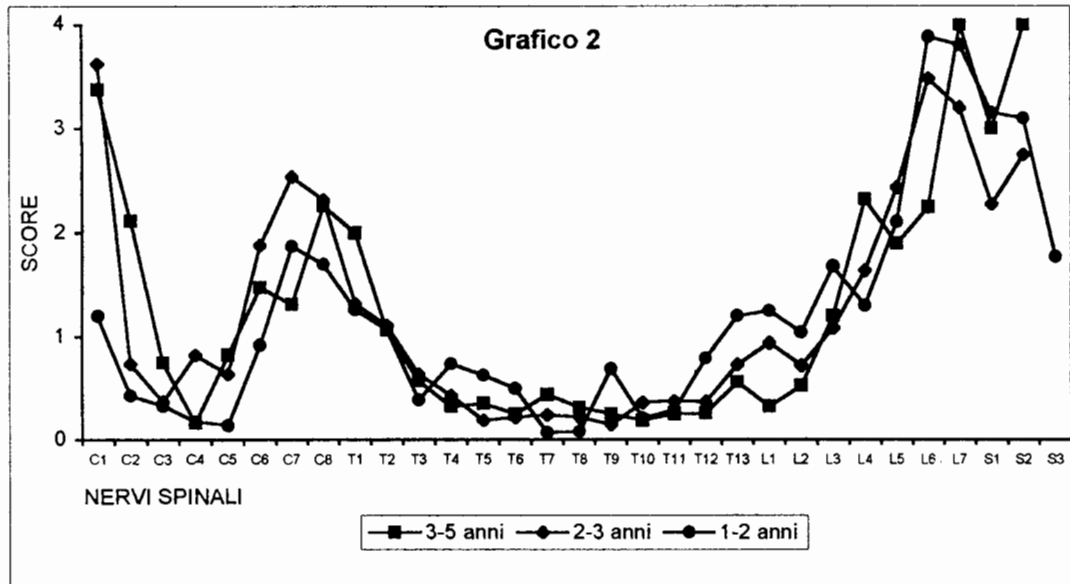
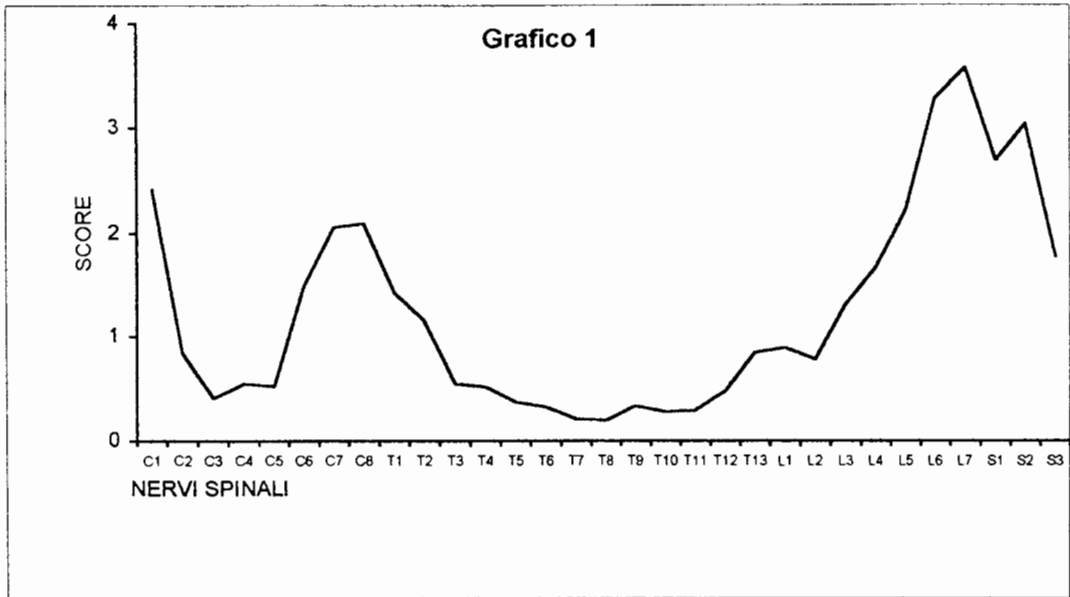
Oggetto delle nostre indagini sono stati 20 ovini di razza Sarda provenienti in numero diverso da 4 allevamenti della Sardegna. Tutti i soggetti presentavano sintomi clinici riferibili a scrapie (8). I 20 ovini, che avevano un’età media di 37 mesi, sono stati stratificati in 3 classi di età: da 1 a 2, da 2 a 3 e da 3 a 5 anni. Come soggetti controllo sono stati utilizzati 4 ovini regolarmente macellati provenienti da allevamenti ritenuti indenni da scrapie. Da tutti i soggetti, sacrificati ad uno stadio clinico conclamato, sono stati prelevati il midollo allungato ed il midollo spinale compreso tra C1 e

S3. Entrambi i distretti tessutali venivano fissati in formalina tamponata al 10% per 20 giorni. Dal midollo allungato sono state effettuate sezioni coronali che, incluse in paraffina e tagliate a 5  $\mu$ , sono state poi colorate con E-E e, per l'evidenziazione della PrPsc, con una metodica immunoistochimica (9) che utilizzava un anticorpo policlonale. Dal midollo spinale sono state eseguite delle sezioni coronali a livello della radice dei nervi spinali dal 1° cervicale sino al 3° sacrale, ottenendo un numero totale di 31 aree da esaminare. Da ciascuna di queste, 6 sezioni seriali dello spessore di 7  $\mu$  sono state colorate con E-E ed esaminate al microscopio ottico con obiettivo 10 X. La gravità della spongiosi è stata valutata in tutta la sostanza grigia impiegando un sistema di punteggio utilizzato da altri Autori (10). Per tutte le aree è stato ottenuto un valore che esprimeva la media dei punteggi attribuiti alle 6 sezioni esaminate. In alcuni soggetti non è stato possibile avere a disposizione tutte le aree perché danneggiate durante il prelievo.

## RISULTATI

Nel midollo allungato di tutti i soggetti che presentavano sintomi riferibili a scrapie sono state osservate le tipiche lesioni spongiformi e gli esami immunoistochimici hanno evidenziato depositi di PrPsc. Esame istologico ed immunoistochimico sono risultati negativi per scrapie in tutti i controlli. Nel midollo spinale la spongiosi del neuropilo appariva fondamentalmente, se non totalmente, distribuita a livello della sostanza gelatinosa del Rolando. Rarissimi erano i vacuoli osservati nel neuropilo sia alla base delle corna dorsali, sia a livello delle corna ventrali. Anche la vacuolizzazione dei grossi motoneuroni delle corna ventrali costituiva un aspetto lesivo assai raro. Da notare che nel midollo spinale di 2 ovini una lieve spongiosi era presente a livello dei segmenti C7-C8 e L6-L7 mentre era praticamente assente in tutte le restanti sezioni.

Nel grafico 1 è rappresentato il profilo istolesivo ottenuto dalla media dei punteggi rilevati in tutti i 20 casi esaminati. Nel grafico 2 e 3 sono riportati rispettivamente i profili istolesivi ottenuti in base alle classi di età e ai 4 allevamenti di provenienza.



## DISCUSSIONE

Le principali caratteristiche del profilo istolesivo del midollo spinale, nei soggetti considerati si possono così riassumere: 1) a livello della fuoriuscita del nervo spinale C1 e nei 2 tratti compresi tra C7-C8 e L6-L7 l'intensità della spongiosi è assai più marcata; 2) essa è localizzata principalmente nelle corna dorsali; 3) l'entità della spongiosi presenta variazioni individuali, mentre la maggiore gravità delle lesioni nelle intumescenze cervico-toracica e lombo-sacrale è costante; 4) non si è riscontrata una differenza degna di nota tra le medie dei profili istolesivi ottenuti per allevamento e classe di età. Questi risultati sembrano concordare solo in parte con quelli ottenuti su ovini inglesi nel 1960 da Wight (11), il quale, sebbene avesse osservato anch'egli una maggiore spongiosi a livello delle intumescenze cervicali e lombari, descriveva principalmente la vacuolizzazione neuronale. Nello stesso lavoro non vengono riferite lesioni nella sostanza gelatinosa del Rolando. Appare interessante notare, piuttosto come i nostri dati presentino corrispondenza con quelli rilevati nella Encefalopatia Spongiforme Bovina (5).

Studi sulla diffusione spazio-temporale dell'agente della scrapie nel SNC di hamsters, infettati sperimentalmente *per os*, hanno dimostrato che il più precoce sito di accumulo di PrPsc è costituito dal segmento T4-T9 del midollo spinale. Inoltre la quantità di PrPsc sembrerebbe correlata con l'infettività e sarebbe maggiore nello stesso segmento di midollo spinale ove è più precoce la sua comparsa post-infezione (7). Considerato che lo sviluppo delle lesioni spongiformi appare correlato sia con l'infettività (6) sia con la presenza del PrPsc (5) si potrebbe ipotizzare che le intumescenze cervico-toraciche e lombo-sacrali, in relazione alla maggiore gravità delle lesioni ivi osservate, rappresentino il sito d'ingresso e di prima localizzazione dell'agente della scrapie nel SNC di ovini. Ulteriori studi volti a definire sia l'immunolocalizzazione che l'entità di accumulo della PrPsc nel midollo spinale, in casi naturali di scrapie ovina, sono comunque necessari per avvalorare la suddetta ipotesi.

*Si ringrazia per la collaborazione il Coadiutore Tecnico Signor Alfio Lai.*

## BIBLIOGRAFIA

1. Zlotnik I: Report of Scrapie Se, ARS, 91-53. Washington DC, US Dept of Agriculture, p. 213, 1964.
2. Wood JLN, McGill IS, Done SH, Bradley R: Neuropathology of scrapie: a study of distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, 140, 167-174, 1997.
3. Fraser H and Dickinson AG: Scrapie in mice: agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Path*, 83, 29-40, 1973.
4. Bruce M, Fraser H: Scrapie strain variation and its implications. In: *Transmissible spongiform encephalopathies*. Chesebro B. W. Ed. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172, 125-138, 1991.

5. Wells GAH, Hawkins SAC, Cunninham AA, Blamire IWH, Wilesmith JW, Sayers AR and Harris P: Comparative pathology of the new transmissible spongiform encephalopathies. In: Bradley R and Marchant B (Eds) *Transmissible Spongiform Encephalopathies*. Proceedings of a Consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities, Brussels, 14-15 September 1993; Dordrecht: Kluwer Academics, p.p. 327-346.
6. Kimberlin RH, Walker CA: Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of CNS following intraperitoneal infection. *J R Soc Med*, 75, 618-624, 1982.
7. Beekes M, Baldauf E, Diringen H: Sequential appearance and accumulation of pathognomonic markers in central nervous system of hamsters orally infected with scrapie. *J Gen Virol* 77, 1925-1934, 1996.
8. Ligios C, Bandino E, Di Guardo G, Ferrari GC, Perfetti MG, Eleni C, Ru G, Muceli G, Spanu GP, Agrimi U, Pocchiari M: Scrapie della pecora: osservazioni cliniche ed epidemiologiche in pecore di razza sarda. *Ob&Do Vet*, 20 (1), 65-70, 1999.
9. Haritani M, Spencer YI, Wells GAH: Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol (Berl.)*, 87, 86-90, 1994.
10. Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IWH, Wells GAH: BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec*, 138, 175-177, 1996.
11. Wight PAL: The histopathology of the spinal cord in scrapie disease of sheep. *J Comp Path*, 70, 70-83, 1960.