



MALATTIE DA PRIONI

# ***Chronic Wasting Disease* dei cervidi: sorveglianza sanitaria, analisi del rischio e ricadute ispettive**

FEDERICA LANDINI<sup>1</sup>, GIOVANNI DI GUARDO<sup>2</sup>

*<sup>1</sup> Specialista in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*

*<sup>2</sup> Professore Associato, Docente di Patologia Generale e Fisiopatologia Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Teramo*



*L'uscita di Argomenti quando coincide col nostro Congresso nazionale assume sempre un tono un po' più speciale per i temi affrontati e lo spessore legato alla loro attualità sindacale e sociale.*

*Anche in questo numero la regola è mantenuta, forse superata, dato che nella parte divulgativa/scientifica che da diversi anni affianca quella sindacale pubblichiamo un approfondimento sulla Chronic Wasting Disease che, oltre al suo indubbio valore scientifico, va a cogliere appieno la necessità di formazione indispensabile per una concreta azione di prevenzione veterinaria.*

*Lo spessore del contributo ha poi convinto la redazione a pubblicarlo per intero, come una vera e propria monografia, dato che la distribuzione su due o più numeri, oltre a rendere frammentario e dispersivo l'apprendimento dell'argomento, non avrebbe reso il giusto merito all'impegno profuso dagli autori cui, con questa breve nota, vanno i nostri ringraziamenti per aver proposto alla nostra rivista la pubblicazione di un lavoro così rilevante.*

**L**a Chronic wasting disease (CWD), o *Malattia del dimagrimento cronico*, è una encefalopatia spongiforme trasmissibile (TSE) che colpisce alcuni ruminanti selvatici della famiglia *Cervidae*. Sebbene sia molto contagiosa tra le popolazioni di cervidi presenti in Nord America e in Canada, molti aspetti rimangono ancora da chiarire, in particolare per quanto riguarda le origini e le modalità di trasmissione, così come l'eventuale esistenza di più ceppi dell'agente causale o le fonti di rischio per altre specie animali, ivi compreso il potenziale rischio zoonosico legato all'esposizione al prione della CWD da parte dell'uomo. Quest'ultimo aspetto riveste una particolare importanza anche in considerazione del fatto che il rischio legato al consumo e alla manipolazione di carne proveniente da cervidi infetti non può essere escluso. Le ricerche finora condotte hanno svelato limiti importanti nell'attività di sorveglianza condotta in ambito di Unione Europea (UE) nei confronti della CWD e, sebbene non sia stato finora accertato alcun caso di positività nei cervidi, tale attività dovrebbe proseguire senza indugio al fine di escludere l'eventuale presenza di TSE nelle diverse popolazioni di ruminanti selvatici. I futuri programmi di monitoraggio e di sorveglianza sanitaria attuati nei confronti delle diverse popolazioni di cervidi presenti in Europa dovrebbero tener conto degli obiettivi da raggiungere e degli ultimi dati scientifici riguardanti la diffusione dell'infezione, i tessuti bersaglio dell'agente, la sensibilità/spe-

cificità dei test diagnostici e le categorie di animali a rischio, unitamente all'età e alla suscettibilità/resistenza genetica dei medesimi. Alla luce di quanto esposto, si ritiene utile fornire una sintetica descrizione delle altre TSE animali, con il precipuo intento di sottolinearne le analogie e/o le differenze rispetto alla CWD.

### **Generalità sulle encefalopatie spongiformi trasmissibili**

Le TSE, o malattie da prioni, sono un gruppo di malattie neurodegenerative ad esito invariabilmente fatale, comuni all'uomo e a diverse specie animali domestiche e selvatiche. Tali malattie sono progressive, contraddistinte da lunghi periodi di incubazione, da un esordio spesso subdolo e poco specifico, da un quadro clinico caratterizzato da una varietà di disturbi neurologici e comportamentali e dall'assenza di reazioni infiammatorie e immunitarie. Le lesioni, pressoché esclusivamente localizzate al SNC e apprezzabili solo istologicamente, sono di tipo regressivo e comprendono: spongiosi della sostanza grigia cerebrale, degenerazione e perdita neuronale, ipertrofia e iperplasia astrocitaria (astrocitosi/astrogliosi). Patognomonicamente è il deposito, a livello sia intracellulare (endoneuronale) sia del neuropilo, (spesso a placche), di aggregati di PrP<sup>Sc</sup>, isoforma patologica di una normale sialoglicoproteina dell'ospite (PrP<sup>C</sup>) (riquadro 1).

La trasmissibilità a specie animali diverse, testimoniata anche dall'epidemia di BSE (*Bovine Spongiform Encephalopathy*) che colpì il Regno Unito nella seconda metà degli anni '80, rappresenta un'altra caratteristica fondamentale che ha determinato un forte stimolo per la ricerca scientifica sulle malattie da prioni. In effetti, le varie TSE descritte nel Regno Unito in diverse specie animali domestiche (gatto) e selvatiche (felidi e ruminanti selvatici mantenuti in cattività) e nell'uomo (variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob, vCJD), quale risultato dell'esposizione (presumibilmente per via orale) all'agente della BSE, confermano tale ipotesi. Si ritiene pertanto legittimo definire il prione della BSE l'unico agente di TSE per il quale sia stata dimostrata una capacità zoonosica. Le TSE umane sono suddivisibili in tre gruppi: sporadiche (CJD sporadica); genetiche (CJD familiare, sindrome di Gerstmann-Straüssler-Scheinker/GSS, Insonnia Familiare Fatale/FFI); iatrogene (CJD iatrogena) [162]. In campo animale, le più note fra queste malattie sono la Scrapie dei piccoli ruminanti (ovini e caprini), che costituisce il "prototipo" delle TSE, la BSE, l'encefalopatia trasmissibile del visone (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME), l'encefalopatia spongiforme del gatto e dei felidi (*Feline Spongiform Encephalopathy*, FSE) e la CWD [159, 163] (tabella 1).

### **La teoria prionica**

Le TSE, o malattie da prioni, sono denominate anche ami-



### Riquadro 1. Patogenesi delle TSE

L'evento patogenetico fondamentale in tutte le TSE umane e animali è costituito da una modificazione conformazionale post-traslazionale della PrP<sup>C</sup> o PrP<sup>sen</sup> (cellulare e sensibile alla proteolisi) nella sua isoforma patologica, PrP<sup>Sc</sup> o PrP<sup>res</sup> (insolubile e resistente alla proteolisi), che si accumula irreversibilmente nelle cellule. Quest'ultima, entrando in contatto con altre molecole di PrP<sup>C</sup>, è in grado di provocarne la trasformazione in PrP<sup>Sc</sup>: si ha così una reazione a catena, in cui ogni molecola appena trasformata (PrP<sup>Sc</sup>) ne trasforma un'altra normale (PrP<sup>C</sup>) nella relativa isoforma patologica (PrP<sup>Sc</sup>). Occorre molto tempo affinché a livello cerebrale si accumulino un quantitativo di PrP<sup>Sc</sup> sufficiente a produrre uno stato di malattia, ed è per questo che il periodo d'incubazione delle TSE è molto lungo [161].

La PrP<sup>C</sup> è normalmente presente come sialoglicoproteina nelle cellule di molti tessuti, soprattutto a livello del SNC (nei neuroni e negli astrociti), ma anche a livello di cuore, muscolo, polmone, intestino, milza, testicolo, ovaio e tessuti linfatici, ove si rinviene ancorata con la sua estremità C-terminale alla membrana citoplasmatica attraverso una molecola glicolipidica (glicosil-fosfatidilinositolato, GPI), associata a sua volta all'attività citotossica dei prioni. La PrP<sup>C</sup> è codificata dal gene *Prnp*, che nell'uomo è localizzato sul braccio corto del cromosoma 20. Tale proteina, pur possedendo la stessa struttura primaria, si differenzia dalla PrP<sup>Sc</sup> per la struttura secondaria (tipica delle proteine globulari solubili in acqua, come le albumine), terziaria e quaternaria. Infatti, mentre nella PrP<sup>C</sup> le catene polipeptidiche hanno una struttura prevalentemente ad "α-eliche", le modificazioni post-traslazionali che comportano l'acquisizione di una struttura prevalentemente a "β foglietti" saranno in grado di conferire patogenicità alla molecola della PrP<sup>Sc</sup>, marcando al contempo le differenze tra le due isoforme proteiche. Questi cambiamenti conformazionali conferiscono alla PrP<sup>Sc</sup>, ovvero all'agente infettante (il prione), delle caratteristiche nuove: esso diviene resistente alla proteolisi e insolubile in detergenti deboli [198].

La PrP<sup>Sc</sup> ha un peso molecolare di 33-35 kDa e, se sottoposta all'azione della proteinasi K, viene parzialmente degradata assumendo un peso molecolare pari a 27-30 kDa. Quest'ultima molecola, polimerizzando, dà luogo a fibrille simil-amiloidotiche denominate SAF (*Scrapie associated fibrils*), evidenziabili al microscopio elettronico. Tali fibrille, di 20 nm di diametro, di 100-200 nm di lunghezza e composte da 2-3 protofilamenti dritti o attorcigliati di 4-6 nm di diametro, si organizzano in depositi presenti a livello cerebrale in tutte le TSE umane e animali [163].

Infine, le malattie prioniche ereditarie, presenti esclusivamente nell'uomo, sono causate da una serie di mutazioni puntiformi del gene *Prnp*, che rendono a loro volta la PrP<sup>C</sup> capace di assumere una conformazione prevalentemente a "beta-foglietti" (PrP<sup>Sc</sup>).

loidosi cerebrali trasmissibili (beta fibrillosi), in quanto spesso si osserva amiloidosi sotto forma di tipici depositi a placca o perivasali.

Tale definizione deriva dal deposito, a livello intraneuronale e del neuropilo, di una particolare proteina amiloidea, la PrP<sup>Sc</sup> (da *Scrapie-Associated Prion Protein*), che rappresenta l'isoforma patologica di una normale sialoglicoproteina di membrana denominata PrP<sup>C</sup> (da *cellular prion protein*). Tale proteina svolge un ruolo fondamentale nella patogenesi delle TSE ed è, tra l'altro, responsabile dello sviluppo delle lesioni a livello del SNC. Ancora da chiarire, invece, quale sia il suo significato eziopatogenetico, ovvero se la stessa sia l'agente responsabile delle TSE, come postulato dalla "teoria prionica" di Prusiner o costituisca, per contro, un semplice prodotto patologico dell'infezione, come sostenuto dalla "teoria virale". La **teoria prionica** (che valse a Prusiner il premio Nobel per la medicina nel 1997), secondo la quale l'agente causale delle TSE sarebbe costituito da una struttura proteica - il prione appunto (acronimo da *proteinaceous infectious particle*) - priva di acidi nucleici e corrispondente alla PrP<sup>Sc</sup>, è sicuramente quella che gode di maggior credibilità, essendo pressoché unanimemente accettata dagli studiosi ( riquadro 2).

A questa teoria si contrappone l'**ipotesi virale** [190], che considera l'agente eziologico costituito da un piccolo acido nucleico associato a una o più proteine da esso codificate.

Una terza ipotesi causale, quella del **virino**, prevede che l'agente eziologico sia formato da un acido nucleico associato a 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 regolarmente osservata in corso di TSE umane e animali [159]. 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<sup>Sc</sup> (apoprione) e acido nucleico (coprione). L'ipotesi prionica, al contrario di quella virale, spiega con maggior difficoltà l'esistenza di più ceppi di agente della Scrapie (distinguibili dal punto di vista clinico, istopatologico e biochimico) e si contrappone a un principio fondamentale della biologia molecolare: gli agenti infettivi, al fine di propagare l'infezione a un organismo ospite devono necessariamente possedere un acido nucleico. Appare quindi estremamente interessante scoprire che anche senza la presenza di un acido nucleico i prioni siano in grado di moltiplicarsi e trasmettere l'infezione [163].

I prioni resistono al calore e ad altri trattamenti comunemente impiegati quali raggi ultravioletti e radiazioni ionizzanti, formalina e calore (utilizzati generalmente per la disinfezione), ma risultano sensibili ai seguenti trattamenti con reagenti chimici:

- ipoclorito di sodio (NaClO) 2% per 1 h;





<b>Tabella 1. TSE animali e umane [48] modificato.</b>		
<b>TSE</b>	<b>OSPITE NATURALE</b>	<b>VIA DI TRASMISSIONE</b>
<b>Scrapie</b>	Pecora, capra, muflone	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della Scrapie)</li> <li>• Trasmissione orizzontale e, con ogni probabilità, anche verticale</li> <li>• Trasmissione per via "iatrogena" attraverso l'impiego di vaccini allestiti con tessuto cerebrale di ovini Scrapie-infetti</li> </ul>
<b>BSE</b>	Bovino, Capra	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE)</li> <li>• Trasmissione verticale non accertata</li> <li>• Sperimentalmente trasmissibile sia alla capra sia alla pecora</li> </ul>
<b>CWD</b>	Cervo dalla coda bianca, alce, cervo dalla coda nera, wapiti, cervo mulo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della CWD)</li> <li>• Trasmissione orizzontale</li> </ul>
<b>TME</b>	Visone	Acquisita (fonte sconosciuta)
<b>FSE</b>	Gatto, puma, ocelot, ghepardo, tigre, leone, gatto dorato asiatico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE.</li> <li>• Trasmissione verticale (ipotizzata, non accertata)</li> </ul>
<b>Encefalopatia Spongiforme degli Ungulati Esotici</b>	<i>Kudu, nyala</i> , antilope	Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE
<b>Scrapie "atipica"</b>	Pecora, capra	Sconosciuta
<b>Encefalopatia Amiloidotica Spongiforme Bovina (BASE)</b>	Bovino	Sconosciuta
<b>KURU</b>	Uomo Guinea)	Ingestione di parti di cadaveri in occasione di riti funerari (Papua-Nuova
<b>Variante della CJD (vCJD)</b>	Uomo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE</li> <li>• Trasfusioni di sangue di pazienti vCJD-infetti</li> </ul>
<b>CJD sporadica</b>	Uomo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sconosciuta</li> <li>• Mutazione somatica o conversione spontanea della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup></li> </ul>
<b>CJD iatrogena</b>	Uomo	Esposizione accidentale, conseguente a procedure e/o trattamenti medico-chirurgici, in cui venga utilizzato materiale CJD-infetto
<b>CJD familiare</b>	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
<b>GSS</b>	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
<b>FFI</b>	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
<b>Insonnia Sporadica Fatale</b>	Uomo	Sconosciuta

- idrossido di sodio (NaOH) 2 M in autoclave a 121 °C per 30 min.;

- aldeide formica (HCHO) 98% per 1 h.

Inoltre, l'assenza di un *pattern* infiammatorio, normalmente presente in corso di malattie infettive, e l'assenza di una risposta immunitaria umorale hanno indotto gli scienziati a definire i prioni come Agenti Infettivi Non Convenzionali (AINC).

#### Trasmissibilità interspecifica delle TSE

In condizioni sia naturali sia sperimentali, la trasmissibilità interspecifica delle TSE dipenderà, a prescindere dalla via di trasmissione utilizzata, dalla percentuale di omologia di sequenza aminoacidica, o di struttura primaria, fra la PrP<sup>Sc</sup> dell'agente causale e la PrP<sup>C</sup> dell'ospite. Ne deriva che, al crescere dell'omologia di sequenza a livello di determinate regioni della molecola, risulteranno aumentate,





## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

### Riquadro 2. I due modelli di Prusiner

La PrP<sup>Sc</sup>, in modo simile a un cristallo, autocatalizza una reazione di polimerizzazione fibrillare, offrendo la propria struttura quale “centro di nucleazione e di stampo” e servendosi della PrP<sup>C</sup> quale precursore polipeptidico amiloideo. I meccanismi molecolari di questo processo, sono stati approfonditamente studiati da Prusiner e si basano su due distinti modelli [3,164]. Il primo modello, denominato “*template-directed refolding*”, prevede l’interazione tra la PrP<sup>Sc</sup> e la PrP<sup>C</sup>, in seguito a cui quest’ultima, viene indotta a trasformarsi nella PrP<sup>Sc</sup>.

Si formerebbe, pertanto, una molecola eterodimerica costituita da due subunità e ciò determinerebbe la modificazione della PrP<sup>C</sup>; alla rottura del dimero seguirebbe la liberazione di due molecole trasformate. In condizioni di normalità, un’elevata barriera energetica impedirebbe la conversione spontanea della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>.

Il secondo modello, denominato “*seeded nucleation*” o “*nucleation polymerization*”, prevede invece che la PrP<sup>C</sup> e la PrP<sup>Sc</sup> coesistano in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l’aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di PrP<sup>Sc</sup> avverrebbero solo quando diverse molecole di PrP<sup>Sc</sup>, per motivi ancora sconosciuti, si organizzano in strutture altamente ordinate e quindi interagiscono insieme con una molecola normale, causandone un’alterazione strutturale. Questo cambiamento produrrebbe una reazione a catena in cui le molecole appena trasformate modificano la forma di altre molecole di PrP<sup>C</sup> e così via, in un processo autocatalitico responsabile del progressivo accumulo di PrP<sup>Sc</sup>.

In questo secondo modello, la PrP<sup>Sc</sup> diviene stabile all’interno della suddetta struttura simil-cristallina; la successiva frammentazione di aggregati di PrP<sup>Sc</sup> può tuttavia aumentare il numero di nuclei di cristallizzazione, i quali possono a loro volta reclutare altre molecole di PrP<sup>C</sup> con conseguente replicazione dell’agente prionico, il che conduce inesorabilmente a morte le cellule nervose che lo contengono (degenerazione spongiforme del tessuto cerebrale). In questo caso, sarebbe corretto parlare di “amplificazione” e non di replicazione, in quanto quest’ultima sarebbe una prerogativa degli agenti infettivi convenzionali dotati di un acido nucleico [44].

contemporaneamente, le probabilità di trasmissione interspecifica. Appare evidente, pertanto, che in tali malattie il fenotipo clinico-patologico costituirà il prodotto dell’interazione tra l’agente infettivo (prione) e il *background* genetico (*Prnp*) dell’ospite. I rapporti esistenti tra la PrP<sup>Sc</sup> e la PrP<sup>C</sup> dell’ospite costituiscono il cardine nella trasmissione delle malattie da prioni, definendo la cosiddetta “barriera di specie” o “barriera di trasmissione” [152], quest’ultima interpretabile come la facilitazione o l’opposizione incontrata dai prioni nella trasmissione interspecifica. Di conseguenza, una TSE derivante da una particolare specie ospite sarebbe trasmessa con maggiore efficacia ad animali di specie simile. Studi biochimici [104, 108] hanno infatti dimostrato che la PrP<sup>Sc</sup> lega preferenzialmente sequenze omologhe della PrP<sup>C</sup>. La barriera di specie può essere altresì superata a seguito di cambiamenti inerenti le proprietà dell’agente infettante: eventi mutazionali, diverse vie di trasmissione o selezione di specie con un tasso molto veloce di “replicazione” dell’agente [43]. In topo, pecora, uomo, capra e cervidi sono stati identificati, in corrispondenza di determinate posizioni (*Open Reading Frame*, ORF) della sequenza nucleotidica del gene *Prnp*, una serie di polimorfismi genetici che, nel caso della Scrapie ovina, sono stati collegati a un’accresciuta oppure a una ridotta suscettibilità genetica nei confronti della malattia [44, 159, 163] (riquadro 3).

### Meccanismi patogenetici

Sebbene sia riconosciuto che l’agente della Scrapie e della BSE possano entrare nell’organismo per via alimentare, le modalità di passaggio attraverso la barriera intestinale, cui consegue il raggiungimento degli organi bersaglio, appa-

iono non del tutto chiare. Alcuni studi dimostrano che durante la fase preclinica l’agente della Scrapie presenta un’intensa attività replicativa negli organi e nei tessuti linfatici dell’ospite (compresa la milza), contrariamente all’agente della BSE [2], sebbene esso sia in grado di esplicare i propri effetti lesivi soltanto sul SNC, che raggiungerebbe per via neurotrofa intra-assonale o per via ematogena (oppure in entrambi i modi), a una velocità che si ritiene essere inferiore, tuttavia, a quella dei virus neurotrofici “convenzionali” [159]. A riprova di ciò, nelle fasi iniziali dell’infezione è stato documentato il duplice coinvolgimento di determinati distretti del sistema linforeticolare (*Lymphoreticular system*, SRL), quali tonsille palatine [183] e placche del Peyer (*Peyer’s patches*, PP) [84]. In corso di Scrapie ovina naturale, oltre che di CWD dei cervidi e, assai presumibilmente, pure di FSE [173], una sede precoce di localizzazione, complementare o alternativa rispetto al tessuto linfoide delle PP, tonsillare e associato alla terza palpebra, è stata identificata anche nei plessi nervosi (plesso mioenterico o di Auerbach e plesso sottomucoso o di Meissner) associati all’intestino (c.d. sistema nervoso enterico, *Enteric Nervous System*, ENS) [20, 21, 45, 46, 65, 121, 124, 216, 217]. La distribuzione dell’agente interesserebbe quasi tutto l’apparato gastro-enterico (esofago, prestomaci, abomaso, piccolo e grosso intestino, retto) degli ovini contraddistinti da un’elevata suscettibilità genetica nei confronti della Scrapie. Più in dettaglio, a livello delle PP e delle tonsille palatine risiedono le cosiddette “cellule M” (*membranous microvillous cells*), una popolazione cellulare precocemente coinvolta nella captazione e, plausibilmente, anche nella replicazione dell’agente infettivo [2, 120]. Tali cellule costituiscono parte



integrante del cosiddetto “linfoepitelio” o “epitelio follicolo-associato” (*Follicle Associated Epithelium*, FAE) annesso all'intestino: la loro funzione potrebbe plausibilmente risiedere nella captazione di antigeni provenienti dal lume enterico e nel successivo trasporto di questi ultimi alle cellule del sistema immunocompetente. Tuttavia, nelle fasi precoci dell'infezione risulterebbero selettivamente coinvolte nell'acquisizione dell'agente e nel conseguente accumulo di PrP<sup>Sc</sup> altre popolazioni cellulari quali i macrofagi a corpo tingibile (*Tingible Body Macrophages*, TBM), nonché i linfociti T e i linfociti B. Questi

ultimi svolgerebbero il duplice ruolo, di elementi cellulari coinvolti sia nel processo di maturazione delle cellule follicolari dendritiche (*Follicular Dendritic Cells*, FDC), un citotipo di rilevanza cruciale ai fini della replicazione prionica, sia nella neuroinvasione in corso di Scrapie sperimentale murina [3, 4, 44, 107, 121]. Dopo l'assunzione per via orale, l'agente infettivo replicherebbe dapprima nelle PP per poi raggiungere per via linfatica i linfonodi mesenterici e, attraverso la via linfo-ematogena, gli ulteriori siti di replicazione a livello di LRS. A ciò conseguirebbe una diffusione attraverso il sistema nervoso autonomo sia al DMNV (via parasimpatica, fibre efferenti), situato nel midollo allungato, sia ai gangli celiaco-mesenterico e mesenterico caudale (CMCG, via simpatica, fibre efferenti) e ai neuroni simpatici popolanti la colonna intermedio-laterale (IMLC) del midollo spinale in corrispondenza dei segmenti T8-T10. Ciò dimostrerebbe una contestuale neuroinvasione attuata dall'agente infettante attraverso le fibre efferenti del nervo splanchnico (localizzate in corrispondenza della IMLC e contraenti rapporti con i neuroni del CMCG), con successiva colonizzazione a opera dello stesso del midollo spinale e infine dell'encefalo [123, 133].

## Sigle

Il numero tra parentesi indica la pagina in cui la sigla è stata citata per la prima volta

Ach – Acetilcolina (8)  
 AINC – Agenti Infettivi Non Convenzionali (4)  
 BASE – *bovine amyloidotic spongiform encephalopathy* (12)  
 BSE – *Bovine Spongiform Encephalopathy* (3)  
 BSE-H – *Bovine Spongiform Encephalopathy high type* (12)  
 BSE-L – *Bovine Spongiform Encephalopathy low type* (12)  
 CMCG – Via simpatica, fibre efferenti (6)  
 CWD – *Chronic Wasting Disease* (3)  
 DMNV – Via parasimpatica, fibre efferenti (6)  
 ENS – *Enteric Nervous System* (6)  
 FAE – *Follicle-Associated Epithelium* (6)  
 FDC – *Follicular Dendritic Cells* (6)  
 FFI – *Insomnia Familiare Fatale* (3)  
 FSE – *Feline Spongiform Encephalopathy*  
 GALT – *Gut-Associated Lymphoid Tissue* (19)  
 GIT – *Gastrointestinal Tract* (9)  
 GPI – Glicosil-fosfatidil-inositolo (4)  
 GSH – Glutazione (8)  
 GSS – *Sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker* (3)  
 IHC – *Immunoistochimica* (9)  
 IMLC – *Colonna intermedio-laterale* (6)  
 MRS – *materiale a rischio specifico* (13)  
 ORF – *Open Reading Frame* (5)  
 PAT – *proteine animali trasformate* (14)  
 PMCA – *Protein Misfolding Cyclic amplification* (19)  
 PP – *Peyer's Patches* (6)  
 RAMALT – *Mucosa ano-rettale* (35)  
 SAF – *Scrapie Associated Fibrils* (4)  
 sCJD – *Forma sporadica della malattia di Creutzfeldt-Jakob* (11)  
 SLR – *Sistema Linforeticolare* (6)  
 SNC – *Sistema nervoso centrale* (3)  
 SOD – *Superossidodismutasi*  
 SOFIA – *Surround Optical Fibr Immunoassay* (35)  
 TBM – *Tingible Body Macrophages* (6)  
 TME – *Transmissible Mink Encephalopathy* (3)  
 TSE – *Transmissible Spongiform Encephalopathies* (3)  
 vCJD – *Variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob* (3)  
 WB – *Western blotting* (10)

## PRINCIPALI TSE ANIMALI

### Scrapie

La Scrapie è una TSE a distribuzione cosmopolita, descritta per la prima volta nel 1732 nel Regno Unito. In Italia la prima segnalazione nell'ovino risale al 1977 in

**Tabella 2. Classificazione rispetto alla resistenza/suscettibilità nei confronti della Scrapie ovina dei diversi genotipi secondo il National Scrapie Plan (NSP, UK, 2009).**

GENOTIPO	RESISTENZA/SUSCETTIBILITÀ
ARR/ARR	Genotipo molto resistente
ARR/AHQ ARR/ARH ARR/ARQ	Genotipi resistenti
AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	Genotipi poco resistenti
ARR/VRQ	Genotipo suscettibile
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	Genotipi molto suscettibili



### Riquadro 3. Funzioni biologiche della PrP<sup>C</sup>

La PrP<sup>C</sup> è presente normalmente nei vertebrati soprattutto a livello delle membrane cellulari neuronali. La maggior parte degli esperimenti effettuati nel campo delle TSE è avvenuta su topi transgenici, il cui DNA era privo del gene *Prnp*. Tali test hanno prodotto risultati controversi, nonostante sia stato indiscutibilmente dimostrato che la mancata espressione della PrP<sup>C</sup> da parte dell'ospite non consente né la replicazione dell'agente, né tanto meno la comparsa e la successiva progressione dell'infezione. Tuttavia, la sua funzione non è stata del tutto precisata. La posizione sulla membrana farebbe ipotizzare un coinvolgimento nei fenomeni di trasduzione del segnale e di adesione cellulare, nonché nel passaggio di sostanze attraverso la stessa. Altri Autori hanno dimostrato una funzione protettiva nei confronti delle membrane: la PrP<sup>C</sup> agirebbe come antiossidante, legando ioni rame (Cu<sup>++</sup>), un cofattore necessario per l'attività catalitica di diversi enzimi soprattutto a livello di SNC [221]. La PrP<sup>C</sup>, essendo una sialoglicoproteina di membrana, potrebbe captare ioni rame presenti in sede extracellulare e agire nei loro confronti come un *carrier* dall'esterno all'interno della cellula. A tal proposito, è stato dimostrato come il rame stimoli l'endocitosi della stessa PrP<sup>C</sup> attraverso vescicole ricoperte di clatrina [153]. È stato altresì ipotizzato che la PrP<sup>C</sup> possa sequestrare gli ioni rame in sede extracellulare e trasportarli all'interno della cellula mediante il proprio dominio transmembranario per poi "presentarli", attraverso il proprio dominio intracellulare, ad apposite proteine citoplasmatiche, proteggendo così i neuroni dalla tossicità del rame libero [31]. Ciò nonostante, la funzione neuroprotettiva della PrP<sup>C</sup> non sarebbe limitata al solo mantenimento dell'omeostasi del rame, ma riconducibile anche al fatto che la sua mancanza darebbe origine a un fenotipo sensibile allo stress ossidativo, che troverebbe il suo fondamento, seppure in parte, nell'alterata omeostasi del glutatione (GSH), uno dei principali regolatori dello stato "redox" cellulare. Ciò contribuirebbe a spiegare l'alterata risposta e l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo, da parte dei neuroni, in corso di TSE [219]. Inoltre, la localizzazione della PrP<sup>C</sup> nei sinaptosomi e la sua associazione con il rame in ambito presinaptico, lasciano intendere che essa possa svolgere un importante ruolo nella normale trasmissione nervosa, intervenendo anche nel metabolismo dell'ossido nitrico (NO) [197,208]. A livello del tratto gastro-intestinale, l'NO è principalmente un neurotrasmettitore ad azione inibitrice nei confronti della muscolatura liscia e agisce anche come neuromodulatore, inibendo o potenziando, a seconda dei casi, il rilascio di acetilcolina (Ach) e di sostanza P (SP) [119]. Molti Autori sostengono che la PrP<sup>C</sup> sia altresì coinvolta nell'omeostasi del Calcio (Ca<sup>++</sup>). In topi *knockout* o privi di PrP<sup>C</sup>, l'assenza di tale proteina è causa di alterazioni nei movimenti di tale ione, permettendo di concludere che, a fronte del chiaro intervento sull'omeostasi del Ca<sup>++</sup>, la PrP<sup>C</sup> sia un'importante componente atta a evitare l'accumulo di tali ioni nella cellula.

Diversi dati emersi di recente suggeriscono ancora che la PrP<sup>C</sup> possa esercitare un'attività citoprotettiva, in particolare contro gli stress intra ed extracellulari in grado di causare apoptosi. Questa attività è stata dimostrata in una varietà di sistemi sperimentali, incluse cellule di mammifero e lieviti [226]. Successivi studi su topi transgenici 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 PrP<sup>C</sup>, estremamente ridotti. Alcuni studiosi hanno avanzato l'ipotesi che la proteina *doppel* possa esplicare, al contrario della PrP<sup>C</sup>, una funzione pro-apoptotica. La Dpl infatti, sintetizzata in quantità eccessive, causerebbe infatti atassia locomotoria nel topo, inducendovi la comparsa di lesioni neurodegenerative [26].

Piemonte [38]. Gli ospiti naturali sono la pecora, la capra e il muflone e la malattia in genere si manifesta in animali adulti di età compresa tra i 2 e i 5 anni. Il decorso clinico è generalmente compreso tra le 8 e le 24 settimane [44].

Il periodo d'incubazione della malattia e il fenotipo clinico-patologico sono influenzati dal ceppo di agente responsabile e dal genotipo dell'ospite, attraverso alcuni polimorfismi dislocati in determinate posizioni o codoni del gene *Prnp* [1,44,159,163]. Le prime evidenze relative al fatto che la Scrapie potesse essere causata da diversi ceppi di agente risalgono agli anni '60 [151] e a oggi sono numerosi i ceppi caratterizzati nel topo. Recentemente sono state identificate forme atipiche di Scrapie, provocate da ceppi prionici aventi profili immunobiochimici della PrP<sup>Sc</sup> diversi da quelli responsabili di Scrapie classica. Tale forma di malattia, riconosciuta per la prima volta nel 1998 in una pecora norvegese, è stata denominata Scrapie Nor98 [25]. La Scrapie atipica differisce dalla forma classica per diversi aspetti: differenze sostanziali riguardano, infatti, l'epidemiologia, la clinica e le caratteristiche immunoistochimiche e immunobiochimiche dei depositi di PrP<sup>Sc</sup>.

ziali riguardano, infatti, l'epidemiologia, la clinica e le caratteristiche immunoistochimiche e immunobiochimiche dei depositi di PrP<sup>Sc</sup>.

#### Suscettibilità nei confronti della malattia

Per quanto riguarda gli ovini, sebbene recenti studi abbiano consentito di individuare una serie di nuovi e importanti polimorfismi del gene *Prnp*, tre sono i "siti" polimorfici della PrP<sup>C</sup> in grado di condizionarne la maggiore o minore suscettibilità nei confronti della malattia. Tali polimorfismi, individuati nei codoni 136 (A/V, alanina/valina), 154 (R/H, arginina/istidina) e 171 (R/Q, arginina/glutamina o, più raramente, R/H, arginina/istidina) [1], sarebbero coinvolti singolarmente in alcune razze, come ad esempio nella Suffolk [66, 225] o nella Sarda [213] relativamente al codone 171, oppure in associazione, come ad esempio nella razza Cheviot in cui, oltre all'accertato ruolo del codone 171, è stato parimenti documentato il coinvolgimento del codone 136 [66]. È stato



altresì dimostrato che le mutazioni ai codoni 136, 154 e 171, dai quali originano 5 diversi alleli, sono appunto correlate alla presenza/assenza della malattia; tali alleli sono in grado di combinarsi in 15 genotipi. Più precisamente, l'allele VRQ è associato al più alto rischio di malattia, ma è poco diffuso e presente solo in alcune razze di ovini, mentre l'allele ARQ, comunque correlato alla presenza della Scrapie, risulta più diffuso. Infine, l'allele ARR sarebbe associato a una bassa o nulla prevalenza della malattia in natura.

L'Unione Europea ha quindi deciso di utilizzare il modello genetico per il controllo delle TSE ovine (Direttiva 2003/100/CEE, successivamente abrogata dal Regolamento 727/2007/CE e infine confluita nel testo aggiornato al 2009 del Regolamento 999/2001/CE) (tabella n. 2).

#### Aspetti eziopatogenetici ed epidemiologici

La Scrapie, congiuntamente alla CWD dei cervidi, mostra le peculiarità tipiche di una malattia infettiva a carattere contagioso. Nonostante le modalità di trasmissione non siano totalmente chiarite, è unanimemente accettato che l'agente della Scrapie possa persistere per anni nell'ambiente contaminato e si ritiene che la placenta di pecore infette possa rappresentare un'importante fonte di infezione nei confronti di altri ovini [6, 11, 166, 194], sebbene studi recenti abbiano evidenziato che anche i fluidi biologici, quali sangue, latte, urina e saliva, possano albergare infettività [8, 105, 187]. Sembra comunque che la via più probabile di ingresso sia quella orale, tramite l'ingestione di organi e tessuti infetti. È stata documentata anche la trasmissione verticale nel periodo prenatale, in seguito a infezione diretta del prodotto del concepimento oppure per via dia-placentare. L'infezione del neonato può anche verificarsi attraverso la suzione di colostro e latte [51, 110], oppure a seguito di contatti intimi e ripetuti con la madre. Un recente lavoro ha dimostrato che le placente di feti portatori del dimorfismo Q171R del gene *Prnp* sarebbero resistenti all'accumulo di PrP<sup>Sc</sup> nella placenta, così come quelli con genotipo ARQ/ARR, [177, 211]. Un altro studio ha dimostrato come lesioni di mastite linfo-proliferativa indotte dal lentivirus della Visna-Maedi predispongano all'accumulo di PrP<sup>Sc</sup> a livello della ghiandola mammaria, con conseguente passaggio di infettività nel latte e successiva trasmissione agli agnelli [116, 118]. L'agente causale, oltre che attraverso la via orale, può infettare l'ospite anche attraverso lesioni cutanee [206]. Alla luce di recenti indagini, inoltre, è stato documentato che infettività in corso di Scrapie ovina si rileva costantemente a livello di encefalo, linfonodi retrofaringei e mesenterici, tonsille palatine, milza, placenta e tratto gastro-intestinale (*Gastrointestinal Tract*, GIT), soprattutto a livello di ileo e colon. Allo stesso modo è stata dimostrata presenza di infettività nel liquido cefalorachidiano, nervo sciatico, ghiandole surrenali, mucosa nasale [160], muscoli scheletrici [7, 28] e lingua [36]; tuttavia, uno studio condotto su

pecore affette da Scrapie non ha evidenziato PrP<sup>Sc</sup> nei tessuti muscolari mediante immunoistochimica (IHC) [77]. La presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata documentata anche nel rene [117, 193], nella pelle [210], nel tessuto linfoide associato alla terza palpebra [145, 147] e nelle ghiandole salivari di topi e visoni infettati sperimentalmente [49, 71]. Bassi livelli di PrP<sup>Sc</sup> sono stati ritrovati anche nelle ghiandole salivari di pecore con genotipo suscettibile alla Scrapie, sia naturalmente sia sperimentalmente infettate [218].

#### Caratteristiche cliniche, neuropatologiche e istopatologiche

Le prime manifestazioni cliniche consistono in genere in disturbi comportamentali caratterizzati da ipereccitazione, aggressività, nervosismo, paura, stato stuporoso e depressione del sensorio, cui fanno seguito progressivamente fenomeni di atassia locomotoria, che esitano a loro volta in una paralisi flaccida o spastica del treno posteriore [44, 115]. Un altro sintomo caratteristico della Scrapie ovina, seppure non patognomonico, risulta essere il prurito, che porta gli animali a grattarsi (*to scrape*) strofinando insistentemente il corpo e la testa contro oggetti fissi. Gli animali colpiti pervengono infine a morte, spesso in condizioni di grave deperimento organico [44]. Il fenotipo clinico-patologico della malattia risulta essere influenzato sia dal ceppo di agente coinvolto sia dalla suscettibilità genetica dell'individuo [44, 159]; come è noto, infatti, il genotipo dell'ospite svolge un ruolo cruciale nel modulare, a seconda dei casi, la suscettibilità o la resistenza nei confronti della malattia, nella specie ovina così come nell'uomo, nel topo, nella capra e nei cervidi. Le lesioni istologiche, rilevabili esclusivamente a livello del SNC, in corrispondenza dei nuclei telencefalici, ipotalamici, talamici, del corpo striato, del peduncolo cerebellare, del cervelletto, del midollo allungato e del midollo spinale, risultano variabili per intensità e distribuzione. Tali lesioni, ripartite generalmente in maniera bilaterale e simmetrica, sono rappresentate da spongiosi della sostanza grigia e, in minor misura, della sostanza bianca, nonché da degenerazione con conseguente perdita neuronale e, infine, da astrogliosi/astrocitosi [44]. Nella Scrapie ovina la lesione d'importanza diagnostica si identifica con la vacuolizzazione neuronale, che si può rinvenire associata ad altre alterazioni neuronali regressive, quali l'iperbasofilia citoplasmatica, la cromatolisi e la necrosi. Essa si riscontra pressoché costantemente a livello del DMNV, della formazione reticolare e dei nuclei vestibolare mediale, cuneato laterale e palloniforme. La spongiosi della sostanza grigia risulta in genere correlata, quanto a intensità della medesima, al ceppo di agente in causa, al genotipo dell'ospite e al periodo di incubazione [44, 159]. Un reperto assai frequente, quantomeno nelle infezioni sperimentali dei roditori e in alcune TSE umane, è inoltre costituito dalla presenza di depositi extracellulari di PrP<sup>Sc</sup> sotto forma di placche (placche amiloidee).



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

### Diagnosi

A oggi non è ancora possibile effettuare diagnosi di Scrapie *intra vitam* in modo certo e inconfutabile, mentre da un punto di vista clinico è possibile avanzare solo una diagnosi di sospetto. È stato infatti dimostrato che la PrP<sup>Sc</sup> può essere rilevata per via biotica a livello dei tessuti linfatici (nella Scrapie e nella CWD) con grande anticipo rispetto alla sua deposizione a livello cerebrale e alla comparsa dei sintomi clinici [67, 147, 148, 184]. Ulteriori studi, aventi lo scopo di individuare nuovi strumenti diagnostici *intra vitam*, sono rivolti a svelare il legame della PrP<sup>Sc</sup> con il plasminogeno [60] in ambito preclinico o la presenza, a livello urinario, di uno specifico “marker” diagnostico d’infezione (uPrP<sup>Sc</sup>) analogo alla PrP<sup>Sc</sup> [189]. Anche la presenza di infettività a livello muscolare farebbe pensare all’utilizzo della biopsia muscolare per la diagnosi *intra vitam* della malattia [28]. Nonostante le succitate metodiche siano promettenti e incoraggianti, è possibile ottenere diagnosi di certezza solamente tramite l’esame istopatologico e la dimostrazione della PrP<sup>Sc</sup> in ambito cerebrale o linfatico, attraverso appropriate tecniche immunostochimiche, su materiale precedentemente fissato in formalina o immunobiochimiche, quali il *Western blotting* (WB), su materiale fresco o congelato oppure mediante la ricerca delle SAF in omogenati di tessuto cerebrale trattati con opportuni detergenti e osservati al microscopio elettronico.

L’immunostochimica (IHC) consente di rilevare al microscopio ottico la presenza di depositi di PrP<sup>Sc</sup> in tessuti fissati in formalina o in altri fissativi mediante l’utilizzo di specifici anticorpi primari (policlonali o monoclonali) nei confronti della PrP<sup>C</sup>, che vengono fatti reagire a loro volta con una miscela di anticorpi secondari appositamente marcati con enzimi (es. perossidasi). L’IHC viene inoltre utilizzata con ottimi risultati su campioni tissutali di SLR, quali ad esempio tonsille palatine, linfonodi e PP, anche per la diagnosi preclinica di Scrapie nelle pecore [5, 215], nonché nella CWD [199] e in altre TSE caratterizzate da accumulo di PrP<sup>Sc</sup> a livello di SLR durante la fase preclinica.

L’immunobiochimica è rappresentata dalla tecnica del WB, che può essere effettuata su materiale fresco o congelato, sia nervoso sia linfatico, preventivamente omogenato e trattato con proteinasi K, presentando peraltro, rispetto all’IHC, il grande vantaggio di consentire l’ottenimento di una serie di informazioni utili anche ai fini della caratterizzazione del ceppo di agente responsabile della TSE di volta in volta studiata [44].

### Sorveglianza ed eradicazione

L’attenzione nei confronti della Scrapie da parte della Comunità scientifica è notevolmente cresciuta nel corso degli ultimi 25 anni. A conferma di quanto sopra si pongono l’evidenza, ottenuta nel 1997, che la vCJD umana fosse legata a una pregressa esposizione dell’uomo all’agente della

BSE [33, 88], nonché l’identificazione di due casi naturali di BSE in capre [54, 95] e l’elevata trasmissibilità sperimentale di tutte le TSE. Il mondo scientifico ha quindi posto l’attenzione sulla possibilità che l’agente della BSE possa circolare nella popolazione ovina in una forma clinicamente indistinguibile dalla Scrapie [62]. Inoltre, non sarebbe da escludere la possibilità che l’agente della BSE, nel salto di specie, acquisisca caratteristiche di trasmissibilità tipiche della Scrapie, che lo renderebbero difficilmente controllabile nella popolazione ovina.

Tuttavia, l’EFSA e l’ECDC sono pervenuti alla conclusione che non sono state finora prodotte evidenze in merito al potenziale zoonosico della Scrapie (classica) e che i dati ottenuti da studi sperimentali condotti su primati e su topi transgenici siano troppo limitati [53]. Pertanto, il potenziale zoonosico dell’infezione rimane ancora da valutare nonostante i dati finora prodotti sull’argomento consentano di inquadrare la Scrapie come una problematica di pressoché esclusiva pertinenza della sanità animale [159]. Con il Regolamento 999/2001/CE la Commissione Europea ha introdotto misure di prevenzione basate su programmi annuali di sorveglianza che ogni Stato Membro ha l’obbligo di attuare, allo scopo di acquisire informazioni epidemiologiche sulla popolazione ovina e caprina, di analizzare i focolai di malattia rilevati dal sistema e di rilevare eventuali casi di BSE nei piccoli ruminanti (al fine di scongiurare che questi casi possano sfuggire al sistema e rappresentare un rischio per la salute dei consumatori). La sorveglianza passiva riguarda gli animali sospetti di malattia, ovvero quelli con sintomatologia clinica. L’attività di sorveglianza passiva nei confronti della Scrapie, inoltre, prevede che tutte le figure professionali denuncino un caso clinico sospetto al Veterinario ufficiale della ASL. Le attività di sorveglianza attiva, invece, sono volte all’identificazione dei casi di infezione negli animali regolarmente macellati per il consumo umano o macellati d’urgenza, nonché in capi morti e nei soggetti abbattuti in relazione a un caso accertato di TSE. L’Italia svolge la propria attività di sorveglianza attiva eseguendo i relativi test rapidi di *screening* sugli ovi-caprini di età superiore ai 18 mesi o con due incisivi permanenti, in base a quanto indicato nell’allegato III del sopracitato Regolamento 999/2001CE e successive modifiche.

Per la Scrapie il numero di campioni da esaminare annualmente per ciascuna Regione viene calcolato dal CEA (Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali, IZS Piemonte, Liguria e Valle d’Aosta, Torino), sulla base dei dati dei volumi di macellazione comunicati da ogni singola Regione. In seguito ad esito positivo del test rapido, il gregge è posto sotto sequestro e, qualora venga confermata la diagnosi dal CEA, la Regione provvederà a decidere per l’abbattimento totale o selettivo del gregge di origine, esclusi gli ovini riconosciuti come geneticamente resistenti. Gli ovini oggetto di attività di sorveglianza, sia attiva sia passiva, sono sottoposti a un primo *screening*



diagnostico mediante test rapido eseguito dall'IZS territorialmente competente su un omogenato di tessuto cerebrale prelevato dal midollo allungato a livello della regione dell'*obex*. Qualora l'esito sia positivo, il campione verrà inviato al CEA per la conferma diagnostica mediante IHC e WB (o altro test rapido). In caso di conferma diagnostica, il CEA invierà a sua volta il campione all'Istituto Superiore di Sanità (ISS), responsabile della caratterizzazione molecolare del ceppo di agente responsabile (al fine di individuare eventuali casi di BSE negli ovini) e dello studio del genotipo ("*PrP genotype*") ovi-caprino.

Le misure di eradicazione che attualmente vengono adottate in caso di conferma di un focolaio di Scrapie rispettano quanto previsto dall'allegato VII del Regolamento 999/2001/CE (e successive modifiche) e dalla normativa nazionale vigente. Esse sono successive alle relative conferme diagnostico-laboratoristiche da parte del CEA e dell'ISS. A tal fine viene previsto l'abbattimento selettivo di tutti gli ovi-caprini ad esclusione dei maschi ARR/ARR e delle femmine portatrici di almeno un allele ARR e non aventi l'allele VRQ. Non viene altresì consentito l'invio al macello delle pecore con genotipo ARR/VRQ. Nel caso in cui il focolaio di malattia sia causato da uno ceppo "atipico" del tipo Nor98, si procederà all'abbattimento dei soli montoni con genotipo sensibile (soggetti ARQ con presenza di fenilalanina al codone 141, nonché soggetti AHQ) e all'obbligo di ripopolare l'azienda solo con montoni in cui i predetti polimorfismi risultino assenti. Gli agnelli e i capretti provenienti da focolai di Scrapie, di età inferiore ai 3 mesi e con genotipo ignoto, verranno inviati al consumo previa asportazione del "materiale specifico a rischio" (definito dal Regolamento 999/01/CE):

- il cranio, compresi cervello, occhi, tonsille e il midollo spinale di animali di età superiore ai 18 mesi o ai quali è spuntato un incisivo permanente;
- la milza e l'ileo degli animali di tutte le età.

Questi tessuti, unitamente agli animali sospettati di essere affetti da una TSE e agli animali abbattuti nel contesto dell'applicazione di misure di eradicazione delle TSE, vengono eliminati conformemente al Regolamento 1069/2009/CE come materiale di categoria 1 e destinati all'incenerimento/coincenerimento, oppure alla sterilizzazione sotto pressione e alla trasformazione in combustibile.

La gestione della Scrapie attraverso gli strumenti di lotta tradizionalmente impiegati in sanità animale per il controllo delle malattie infettive è resa particolarmente difficile dal lungo periodo di incubazione, che spesso corrisponde o supera la vita commerciale degli ovini, nonché dall'assenza di un test diagnostico *ante mortem* e dall'abilità dell'agente patogeno di contaminare per lunghissimi periodi i pascoli e l'ambiente. L'unica arma di prevenzione quale strumento fondamentale per arginare i seri problemi che la Scrapie crea al comparto zootecnico ovino, in termini economico-finanziari, sembra essere per-

tanto la selezione genetica (effettuata attraverso il Piano Italiano di Selezione Genetica per la Resistenza alle TSE Ovi-Caprino istituito con il Decreto Ministeriale del 17 dicembre 2004).

Considerato che i piani di selezione genetica rappresentano, a oggi, l'unica arma di prevenzione al fine di concorrere all'eradicazione della Scrapie, l'obiettivo è incrementare la frequenza dei caratteri di resistenza genetica alle TSE nella popolazione ovi-caprina, creando in tal modo greggi a "basso rischio" di TSE e contribuendo alla tutela della salute umana e animale. L'incremento dei caratteri di resistenza viene realizzato attraverso la costituzione di serbatoi di arieti omozigoti resistenti (ARR/ARR), nonché mediante l'eliminazione dei capi con l'allele VRQ e la diminuzione della frequenza dell'allele ARQ.

### Encefalopatia spongiforme bovina

L'Encefalopatia spongiforme bovina (BSE) è stata osservata originariamente nel Sud della Gran Bretagna nel novembre 1986 e diagnosticata per la prima volta presso il *Central Veterinary Laboratory* di Weybridge [222]. Segnalata successivamente in diversi Paesi europei, ha assunto velocemente le caratteristiche di un'epidemia, colpendo molti allevamenti. Si ritiene che la fonte dell'epidemia sia stato l'impiego, attraverso l'industria del *rendering*, di tessuti di animali affetti da Scrapie/BSE (non diagnosticata) per l'alimentazione animale. La "sopravvivenza" dell'agente infettante sarebbe stata favorita, infatti, dai cambiamenti tecnologici intervenuti nel processo di lavorazione delle farine animali: drastica riduzione o addirittura abbandono dell'impiego di solventi organici idrocarbonati utilizzati per massimizzare l'estrazione del grasso dalle farine di carni e ossa ottenute, e contemporanea adozione di sistemi di trasformazione "in continuo" che prevedevano l'applicazione di temperature più basse rispetto alle precedenti o un'esposizione più breve al calore. I cambiamenti nei processi di preparazione delle farine di carne e ossa esposero i bovini così alimentati, presumibilmente, a livelli di infettività tali da superare la barriera di specie, innalzando in tal modo il rischio di infezione. L'epidemia avrebbe quindi trovato ulteriore impulso grazie a modalità di contagio intraspecifico di natura "simil cannibalistica", nello stesso modo in cui, alla fine degli anni '50, era successo in Papua-Nuova Guinea con l'epidemia di Kuru [44]. A seguito della comparsa nel 1996 della vCJD [229], diversa dalla sCJD (forma sporadica della malattia di Creutzfeldt-Jakob) per l'età delle persone colpite (15-50 anni), per la tipologia delle lesioni neurologiche (presenza di placche amiloidi "floride" in sede cerebrale) e per le sedi e le modalità di accumulo della PrP<sup>Sc</sup> (rispetto alla forma sporadica, non solo nel tessuto cerebrale, ma anche nei tessuti linfatici, soprattutto a livello tonsillare e di PP), l'attenzione della Comunità scientifica e dell'opinione pubblica



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

nei confronti della BSE è aumentata esponenzialmente. I motivi sono da ricercare nel fatto che alla base della trasmissione della malattia, sembrerebbe esserci l'ingestione di carne bovina infetta [33, 88], dimostrando così il possibile salto di specie, almeno in condizioni naturali. Tale tesi è stata ulteriormente avvalorata dal documentato passaggio dell'agente della BSE a diverse specie animali domestiche e selvatiche (tabella 1), oltre che dalla comparsa della malattia in due capre [54, 95]. Il Governo inglese decise, a partire dal luglio del 1988, il divieto di utilizzo di farine di carne contenenti proteine di ruminanti per l'alimentazione dei bovini, mentre nel 1990 entrò in vigore l'obbligo di distruggere il materiale che, per analogia con la Scrapie, veniva ritenuto potenzialmente infetto. Dopo questi provvedimenti, l'epidemia di BSE ha subito negli anni una consistente riduzione. La Comunità Europea inoltre, a seguito dell'evidenza nel 1997 che la vCJD fosse legata all'esposizione umana all'agente della BSE, ha posto particolare attenzione sulla possibilità che il suo agente causale potesse circolare nella popolazione ovina inducendovi la comparsa di una forma clinicamente indistinguibile dalla Scrapie e ha reso pertanto obbligatori, in ciascuno Stato Membro, programmi di sorveglianza, sia attiva sia passiva (Regolamento 999/2001/CE e successive modifiche).

Particolare menzione va fatta anche alla BASE: nei primi anni del terzo millennio sono state, infatti, riconosciute nuove forme atipiche di BSE, denominate rispettivamente *high type* (BSE-H) e *low type* (BSE-L) in base alla differente migrazione elettroforetica della banda non glicosilata della PrP<sup>Sc</sup> bovina. Anche la BASE è stata definita una forma atipica di BSE per le rilevanti peculiarità molecolari e neuropatologiche presenti in questa particolare TSE e poiché la PrP<sup>Sc</sup> ad essa associata è risultata paragonabile a quella della BSE-L. La malattia è stata scoperta da alcuni studiosi del CEA e rappresenta, forse, un secondo "istotipo" della BSE [35]. Essa colpisce prevalentemente bovini di età avanzata (superiore agli 8 anni). In proposito, alcuni degli animali sottoposti a sorveglianza attiva, di età compresa tra i 5 e i 15 anni, sono stati esaminati per caratterizzare gli aspetti molecolari e neuropatologici della malattia. In effetti, il *pattern* di distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> osservato in due bovini anziani era diverso da quello della BSE, mentre l'analisi del gene *Prnp* non ha mostrato differenze. All'analisi istologica è stato altresì dimostrato che la PrP<sup>Sc</sup>, nella BSE classica, si accumula nella sostanza grigia cerebrale, mentre nella BASE si depositerebbe anche a livello della sostanza bianca, formando aggregati e placche dense di forma tondeggianti molto simili alle placche amiloidotiche rilevate in corso di Kuru. La BSE e la BASE, infine, mostrano notevoli differenze anche nella distribuzione topografica dei depositi di PrP<sup>Sc</sup>. Negli animali con BSE, infatti, i depositi granulari di PrP<sup>Sc</sup> sono diffusi soprattutto a livello del midollo allungato; nella BASE, al contrario, il midollo allungato mostra solo una debole

immunoreattività nei confronti della PrP<sup>Sc</sup>. In questi animali, infatti, i depositi di PrP<sup>Sc</sup> sono osservabili nel talamo e nel bulbo olfattivo, ma soprattutto negli strati profondi della corteccia cerebrale e nella sostanza bianca subcorticale. In un recente studio [203], inoltre, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata riscontrata anche all'interno di fibre muscolari di bovini con BASE naturale e sperimentalmente indotta. Il modesto coinvolgimento del midollo allungato nella BASE suggerirebbe inoltre una modalità di neuroinvasione seguita dall'agente eziologico alternativa rispetto al GIT. A meno che l'agente della BASE si propaghi attraverso la via olfattiva o altre vie periferiche, è possibile che questa patologia rappresenti una forma sporadica di TSE nel bovino, supportando in tal modo una nuova ipotesi sulla comparsa della BSE nel Regno Unito, in alternativa alle prime ipotesi relative al passaggio dell'agente della Scrapie al bovino.

### Aspetti eziopatogenetici ed epidemiologici

Circa l'origine della BSE, l'ipotesi più convincente rimane ancora quella della Scrapie ovina, che troverebbe il suo fondamento nel fatto che la BSE originariamente è comparsa nel Regno Unito e che nessun'altra popolazione bovina sarebbe risultata infetta per mezzo di una fonte "autoctona". Questo raffronto geografico ha evidenziato che la Scrapie ovina era endemica nel Regno Unito (con un rapporto ovini/bovini elevatissimo) e che le farine di carne e ossa erano comunemente utilizzate nell'alimentazione dei bovini. A ciò bisogna aggiungere che le procedure del *rendering*, almeno inizialmente, erano tali da prevenire un effettivo rischio per la popolazione bovina, ma che a seguito dei cambiamenti introdotti potevano aver prodotto una vasta esposizione [228].

Origini diverse da quelle della Scrapie sono state considerate nella prima fase dell'epidemia e hanno contemplato anche un'origine dal bovino, considerando principalmente l'evenienza di una forma sporadica di BSE nella popolazione bovina che, non diagnosticata, sarebbe entrata attraverso il *rendering* nella catena alimentare. Questa tesi è fondamentalmente smentita dal fatto che la BSE in forma epidemica si è originariamente manifestata soltanto nel Regno Unito e in nessun altro Paese. In proposito, gli studi condotti per accertare l'eventuale trasmissione orizzontale dell'agente della BSE dalla madre al neonato dopo il parto hanno valutato l'infettività della placenta, dei tessuti embrionali e delle lochiazioni, sortendo esito costantemente negativo nelle relative prove biologiche effettuate su topi; anche l'infezione sperimentale di 12 vitelli, inoculati per via nasale e orale con un omogenato di membrane fetali proveniente da bovine affette da BSE all'ultimo mese di gravidanza, ha fornito esito negativo [223]. Per quanto riguarda la patogenesi della BSE, diversamente da quanto osservato in corso sia di Scrapie naturale che di BSE sperimentalmente indotta nella pecora e nella capra, nessun coinvolgimento apprezzabile è stato descritto per milza,



linfonodi, SLR, ghiandola mammaria, placenta e GIT di bovini con BSE, ad eccezione della porzione distale dell'ileo [44, 224].

### Caratteristiche cliniche e neuropatologiche

La BSE è una malattia neurodegenerativa cronica ad esito costantemente fatale, 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 a un'età inferiore ai 2 anni [44]; viene comunemente chiamata "Morbo della mucca pazza" (*mad cow disease*) a causa della sintomatologia neurologica che la caratterizza. La malattia generalmente esordisce in modo subdolo: nella fase iniziale sono presenti esclusivamente segni clinici aspecifici quali riduzione della produzione latte e dimagrimento (con o senza diminuzione dell'appetito), mentre soltanto in una seconda fase compaiono i sintomi neurologici. Il decorso clinico della BSE varia in media dalle due alle otto settimane.

Possono essere osservate modificazioni del comportamento quali apprensione e timore, digrignamento dei denti, impennamenti della testa, aggressività (scalciare o caricare), nervosismo di fronte a porte o recinti, aumento delle vocalizzazioni. Sono presenti anche alterazioni della sensibilità quali iperreattività a stimoli sonori, tattili, visivi, scialorrea, scuotimento della testa, movimenti anomali delle orecchie, leccamento frequente del musello, movimenti rapidi della lingua. A questi possono seguire modificazioni del movimento quali ipermetria degli arti anteriori e posteriori, cadute, decubito obbligato, tremori e fascicolazioni muscolari. Con il progredire della malattia l'animale presenta una crescente difficoltà ad alzarsi fino a rimanere in decubito obbligato.

### Caratteristiche istopatologiche

In sede di esame *post mortem* non si evidenziano lesioni macroscopiche a livello di SNC. L'esame istologico viene di regola effettuato su sezioni di tessuto cerebrale fissato in formalina e incluso in paraffina, previamente sottoposte a colorazione con ematossilina-eosina.

I reperti istopatologici sono limitati al SNC e sono di natura degenerativa. Le lesioni che si osservano a tale livello sono state complessivamente definite come una triade di alterazioni neuro-istologiche: spongiosi del neuropilo, degenerazione neuronale e astrogliosi/astrocitosi. La spongiosi si presenta in maniera ripetitiva, con lesioni simmetriche prevalenti all'interno della sostanza grigia dei nuclei del tronco encefalico (midollo allungato e protuberanza anulare); queste possono estendersi, anteriormente, fino al mesencefalo e, posteriormente, fino al midollo spinale cervicale [44].

Le vacuolizzazioni si osservano sia nel pericario dei neuroni, sia nel neuropilo della sostanza grigia, in corrispondenza dei nuclei del tronco encefalico (più frequentemente

rispetto alla Scrapie). Spesso è presente una concomitante necrosi coagulativa di singoli neuroni (necrosi solitaria). Le lesioni a carattere spongiforme possono essere accompagnate da una più o meno marcata ipertrofia e iperplasia degli elementi astrocitari.

### Diagnosi

Come per la Scrapie, la diagnosi di certezza nei confronti della BSE viene effettuata mediante appropriate indagini istopatologiche, immunoistochimiche (su tessuto precedentemente fissato in formalina) e immunobiochimiche (WB su tessuto cerebrale fresco e congelato), nonché attraverso l'evidenziazione di strutture simili alle SAF mediante microscopia elettronica [44].

### Sorveglianza ed eradicazione

L'attività di sorveglianza nei confronti della BSE prevede: sorveglianza passiva, sorveglianza attiva ed eradicazione. Il Regolamento 999/2001CE individua 5 capisaldi su cui concentrare le misure di sorveglianza:

1. misure di sorveglianza sanitaria sui bovini;
2. misure di eradicazione negli allevamenti colpiti dalla malattia;
3. misure di controllo sui mangimi;
4. obbligo di eliminazione di materiale specifico a rischio (MSR) nei macelli;
5. classificazione dei Paesi in funzione del rischio relativo alla BSE.

L'attività di sorveglianza passiva prevede che tutte le figure professionali denuncino al Veterinario ufficiale della ASL la presenza di ogni caso clinico sospetto. Anche per la BSE, in caso di denuncia, il Veterinario ufficiale ASL, dopo aver posto sotto sequestro il capo sospetto, effettuerà le opportune indagini cliniche e diagnostiche per ottenerne la relativa conferma e, in caso positivo, disporrà l'abbattimento dell'animale e il successivo prelievo dell'encefalo *in toto* per le relative indagini laboratoristiche, unitamente al sequestro dell'allevamento bovino in attesa degli esiti delle suddette indagini.

L'Italia svolge la propria sorveglianza attiva eseguendo test rapidi di *screening* sugli animali regolarmente macellati e su altre categorie di bovini.

Per la BSE viene effettuato il campionamento di tutti i bovini di età superiore ai 48 mesi appartenenti alle categorie a rischio (macellati d'urgenza, differiti, morti) e di età superiore ai 72 mesi per i capi regolarmente macellati (con la Decisione 2013/76/UE, tale vincolo è stato sospeso per alcuni Stati membri a partire dal 1° luglio 2013). Tramite il CEA vengono inoltre coordinate le attività dei laboratori periferici, per i quali la concordanza degli esiti dei test rapidi è garantita da specifici "ring test" e dalle attività di *audit* svolti anche con la presenza di funzionari del Ministero della Salute. Le Regioni sono responsabili della corretta attuazione sul territorio di loro competenza delle misure previste attraverso il controllo dei Veterinari ulti-



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

ciali delle ASL.

Le aziende zootecniche bovine, ai sensi del DPR 317 del 30.04.1996 (e successive modifiche) e in applicazione della Direttiva 92/102/CEE, devono essere registrate presso i Servizi veterinari delle ASL, che sono altresì responsabili dell'attribuzione del codice aziendale che individua il luogo geografico dove vengono detenuti gli animali e che qualifica la struttura come unità epidemiologica. La BSE, come la Scrapie, è stata inclusa nelle malattie soggette a denuncia obbligatoria con l'Ordinanza Ministeriale del 10 maggio 1991.

In Italia, in caso di conferma della presenza di BSE in allevamento, a partire dal dicembre 2001 è in vigore una circolare ministeriale che prevede, in ottemperanza a quanto previsto dal Regolamento 999/2001/CE, la possibilità di ricorrere a due distinte opzioni di eradicazione:

- abbattimento dell'intero effettivo bovino presente in azienda;

- abbattimento della coorte di nascita (soggetti nati un anno prima e un anno dopo la nascita del bovino infetto; discendenza, ovuli ed embrioni del capo infetto) e della coorte alimentare (soggetti che hanno condiviso nel loro primo anno di vita lo stesso alimento utilizzato nel primo anno di vita dal capo malato).

Secondo l'OIE (*Office International des Epizooties*), principale organizzazione mondiale che fissa le condizioni sanitarie per le transazioni commerciali di animali e prodotti in tutto il mondo, deputata anche a stilare una classifica dei Paesi in funzione del rischio BSE, i Paesi sono classificati secondo tre distinte categorie:

1. Paesi a rischio trascurabile;
2. Paesi a rischio controllato;
3. Paesi a rischio indeterminato.

L'Italia è stata classificata recentemente, in categoria 1 (Comunicato del Ministero della Salute n. 155 del 12/07/2013). In tale categoria sono raccolti i Paesi che, pur essendo stati esposti a fattori di rischio quali l'introduzione di bovini da Paesi in cui la BSE era presente o di farine di carne provenienti da quegli stessi Paesi, hanno messo in atto misure per gestire e controllare la diffusione della malattia sul proprio territorio. Per quanto riguarda invece l'utilizzo di mangimi contenenti farine di carne e ossa per l'alimentazione dei ruminanti, secondo il Regolamento 999/2001/CE, è vietato nutrire i bovini, gli ovini e i caprini con farine di carne e ossa di mammiferi. Inoltre, al fine di gestire il rischio che materiali vietati, provenienti da una contaminazione crociata, possano entrare nell'alimentazione dei ruminanti, l'Unione Europea ha totalmente vietato l'utilizzazione delle Proteine Animali Trasformate (PAT) negli alimenti destinati agli animali allevati a fini di produzione alimentare, fatte salve alcune eccezioni (come nel caso dell'utilizzazione di farine di pesce per i non ruminanti). Per quanto riguarda invece l'eliminazione del materiale a rischio specifico (MRS), questa è definita dall'allegato IV del Regolamento

999/2001/CE:

- il cranio, esclusa la mandibola e compresi il cervello e gli occhi, nonché il midollo spinale degli animali di età superiore ai 12 mesi;

- la colonna vertebrale, escluse le vertebre caudali, le apofisi spinose e i processi trasversi delle vertebre cervicali, toraciche e lombari e la cresta sacrale mediana e le ali del sacro, ma inclusi i gangli della radice dorsale dei bovini di età superiore a 30 mesi (modifica attuata dal Regolamento 357/2008/CE);

- le tonsille, gli intestini dal duodeno al retto e il mesentere dei bovini di qualunque età (modifica attuata dal Regolamento 722/2007/CE).

Questi tessuti, congiuntamente agli animali sospettati di essere affetti da una TSE e agli animali abbattuti nel quadro delle misure di eradicazione delle TSE, dovranno essere eliminati conformemente al Regolamento 1069/2009/CE come materiale di categoria 1.

### Encefalopatia trasmissibile del visone

L'encefalopatia trasmissibile del visone (*Transmissible Mink Encephalopathy*, TME) è una malattia conosciuta fin dal 1947 e riscontrata in allevamenti americani. Da allora in poi, una serie di focolai si sono verificati in varie parti del mondo, principalmente negli Stati Uniti, in Canada, in Finlandia, nell'ex-Germania dell'Est e nelle Repubbliche dell'ex-Unione Sovietica [82]. L'ultimo episodio è stato segnalato nel 1985 negli Stati Uniti. Sei focolai sono stati riportati dal 1947 al 1985 in Nord America e diversi sono stati collegati a mangimi commerciali contaminati dall'agente della Scrapie [82]. Anche se la contaminazione dei mangimi a opera dell'agente della Scrapie è stata proposta quale causa della TME (con un'analoga distribuzione delle lesioni spongiformi nel cervello e con la comparsa di una sintomatologia neurologica sovrapponibile), il visone non è tuttavia risultato essere suscettibile alla Scrapie ovina, in seguito a infezione per via orale, fino a 4 anni dopo il *challenge* sperimentale [81]. Ciò suggerirebbe che la Scrapie possa non rappresentare la fonte di infezione o che, in alternativa, solo alcuni ceppi di agente della Scrapie siano in grado di indurre la comparsa di malattia nel visone [15, 172]. Indagini epidemiologiche effettuate nel Wisconsin su visoni d'allevamento in alcuni focolai di TME hanno altresì indicato il bovino come possibile fonte di contagio, in quanto gli animali erano stati prevalentemente alimentati con tessuti provenienti da bovine da latte malate o morte e non da ovini [125]. Sperimentalmente, i bovini inoculati con l'agente della TME manifestano un'encefalopatia spongiforme dopo un periodo di incubazione di 18,5 mesi e, per contro, visoni inoculati per via intracerebrale con l'agente patogeno proveniente dai suddetti bovini si ammalano dopo un periodo di incubazione di 7 mesi. Inoltre, gli studi sperimentali condotti al riguardo





hanno dimostrato che le lesioni cerebrali osservate in corso di BSE e di TME sono diverse [125, 126, 171]. Questo suggerisce che la principale via di contagio sia quella alimentare, legata all'utilizzo di mangimi contaminati da tessuti di visone infetti, oppure che, alla luce delle recenti scoperte, la stessa possa essere messa in relazione ad altre TSE documentate nella specie bovina [35]. La TME, infine, è stata sperimentalmente trasmessa ad altre specie animali quali il procione (*Procyon lotor*) a seguito di infezione per via orale, nonché alla puzzola (*Mustela putorius*), alla martora (*Martes martes*), alla faina (*Martes foina*), al criceto (*Cricetus cricetus*), al furetto (*Mustela putorius furo*) e a primati non umani; ciò nonostante, il lungo periodo di incubazione osservato in queste ultime specie suggerirebbe l'esistenza di una efficace barriera di specie.

#### Aspetti eziopatogenetici ed epidemiologici

Oltre alla trasmissione per via orale con tessuti BSE-infetti, gli studi dimostrano come ferite alla lingua, nei criceti, possano facilitare la trasmissione dell'agente della TME. Durante un focolaio, l'infezione potrebbe essere in grado di diffondere tra animali della stessa gabbia a causa di fenomeni di cannibalismo: a tal proposito, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata documentata nei linfonodi mesenterici, milza, timo, reni, fegato, intestino e ghiandole salivari di visoni infettati sperimentalmente. Non è stata finora dimostrata la trasmissione verticale della TME, che sarebbe pertanto una malattia a fondo cieco senza possibilità di diffusione se non per cannibalismo.

#### Caratteristiche cliniche e neuro-istopatologiche

La TME ha un periodo di incubazione medio di più di 7 mesi e i sintomi durano generalmente da 3 giorni a 6 settimane. Inizialmente sono piuttosto blandi: i visoni cominciano a disperdere i propri escrementi nelle gabbie, a calpestare il mangime, oppure a mangiare con difficoltà. Con il progredire della malattia, gli animali colpiti divengono eccitati, arcuando la coda sopra la schiena come gli scoiattoli. Possono altresì mostrare incoordinazione e difficoltà motorie. Negli stadi avanzati gli stessi soggetti mostrano movimenti di maneggio e si mordono la coda fino a divenire, in prossimità della morte, soporosi e areattivi nei confronti degli stimoli esterni. Le lesioni istologiche, bilaterali e simmetriche, appaiono confinate al SNC [171]. La spongiosi della sostanza grigia, unitamente alla degenerazione e a una necrosi neuronale diffusa con contestuale astrogliosi/astrocitosi, rappresentano reperti patognomoni. Le suddette alterazioni riguardano la corteccia cerebrale, il diencefalo, il mesencefalo e, in misura minore, il tronco encefalico, mentre le stesse risultano assenti nel cervelletto e nel midollo spinale. Non sono altresì presenti depositi di PrP<sup>Sc</sup> in forma di placche amiloidi. L'IHC, il WB, e l'ELISA sono le metodiche diagnostiche d'elezione per la diagnosi definitiva di TME.

#### Sorveglianza e controllo

Negli Stati Uniti è vietato impiegare tessuti a rischio provenienti da ovi-caprini e bovini o parti di animali sospetti di TSE per l'alimentazione dei mustelidi. Poiché l'agente della TME può essere correlato alla BSE, alla Scrapie o ad altre TSE, i tessuti provenienti da visoni, negli Stati Uniti, non sono ammessi nella preparazione di mangimi per ruminanti. La TME è una malattia soggetta a denuncia negli USA: ogni animale sospetto deve essere abbattuto, mentre la testa o il cervello dovranno essere inviati ai laboratori preposti a effettuare la relativa diagnosi.

#### Encefalopatia spongiforme felina

Questa TSE colpisce i gatti domestici (*Felis catus*) e diverse specie di felidi selvatici, tra cui ghepardo (*Acinonyx jubatus*), ocelot (*Felis pardalis*), puma (*Felis concolor*), leone (*Panthera leo*), tigre (*Panthera tigris*), leopardo (*Leopardus pardalis*) e gatto dorato asiatico (*Catopuma temminckii*); questi ultimi sono risultati positivi alla FSE in alcuni giardini zoologici inglesi. Il primo caso accertato di malattia nel gatto risale al 1990 nel Regno Unito, durante l'epidemia di BSE. Da allora si sono verificati oltre un centinaio di casi in soggetti dai 5 anni di età in poi, quasi tutti provenienti dal Regno Unito [14]. Tuttavia, sono stati descritti due ulteriori casi di malattia segnalati in gatti selvatici senza un apparente collegamento diretto con il Regno Unito: un gatto dorato asiatico, allevato in Germania e poi esportato in Australia, dove ha sviluppato la FSE [240] e un ghepardo nato nel Regno Unito, che ha successivamente manifestato la malattia in Francia. La scoperta di un siffatto caso potrebbe indicare la possibilità di una trasmissione verticale/perinatale dell'infezione nei ghepardi [24]. Numerosi dati supportano l'ipotesi che la FSE sia derivata dalla BSE: le due malattie, infatti, sono state trasmesse con successo a topi *wild-type* e si è constatato che il periodo di incubazione, i segni clinici e le caratteristiche istopatologiche risultavano sovrapponibili per entrambe [32]. Inoltre, l'IHC e il WB hanno consentito di rilevare un *pattern* di deposizione della PrP<sup>Sc</sup> nell'ippocampo, nell'ipotalamo e nel cervelletto dei suddetti animali pressoché sovrapponibile per entrambe le TSE in questione [24, 113].

#### Aspetti eziopatogenetici ed epidemiologici

La trasmissione dell'infezione sembra avvenire attraverso il consumo di alimenti contaminati dall'agente della BSE e ciò trova conferma nel fatto che, a seguito della diminuzione dei casi di BSE, si è verificata una pari riduzione dei casi di FSE, che si riscontra prevalentemente in gatti di sesso maschile, appartenenti alla razza comune europea e aventi un'età media al momento della comparsa dei primi sintomi pari a circa 7 anni.

In tutti i casi descritti la FSE mostra un'insorgenza e una progressione graduale e le manifestazioni cliniche si pro-





## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

traggono per un tempo variabile dai 3 ai 5 mesi; trascorso questo periodo, gli animali colpiti vengono generalmente sottoposti a eutanasia. Le modalità di trasmissione della TSE nella specie felina non sono del tutto note e, sebbene in altre specie animali alcune TSE possano trasmettersi per via verticale (infezione trans-placentare) e/o per via percutanea, la via di infezione più probabile è quella orale, tramite ingestione di materiale alimentare infetto e/o contaminato. Nel 1998 in Italia è stato rilevato un caso di sCJD in un paziente, associato alla contestuale comparsa di un inedito caso di TSE nel gatto di cui era proprietario [241]. Mediante WB effettuato sul tessuto cerebrale sia del gatto sia del suo proprietario, è stato possibile dimostrare che entrambi i casi di TSE non risultavano attribuibili a una pregressa esposizione all'agente della BSE. È stata pertanto ipotizzata l'esistenza di una nuova forma di TSE felina la cui origine e le cui modalità di trasmissione risultano a tutt'oggi ignote. Ciò ha indotto il Ministero della Salute a finanziare un progetto di ricerca con lo scopo di individuare la presenza di casi di FSE in Italia. Tale progetto è stato svolto dal CEA, in collaborazione con l'IZS della Sardegna, l'IZS della Sicilia, le Facoltà di Medicina Veterinaria di Padova, Perugia e Pisa. Al riguardo, nel periodo giugno 2003-giugno 2005 sono stati inviati al CEA, a cura delle varie Unità Operative partecipanti al progetto, 110 campioni di tessuto cerebrale di altrettanti gatti nei quali era stata osservata una sintomatologia nervosa; in nessuno dei suddetti casi è stata riscontrata positività nei confronti della FSE [92, 93]. Nei felidi affetti da FSE, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata dimostrata a livello di SNC, retina, nervi periferici, milza e altri organi e tessuti linfatici, ileo e rene [87]. A tal proposito, degno di nota appare uno studio condotto su reni e ghiandole surrenali di ghepardo in corso di FSE: mediante WB, infatti, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata rilevata anche in questi tessuti [114].

### Caratteristiche cliniche e neuro-istopatologiche

La sintomatologia nervosa che contraddistingue la FSE risulta caratterizzata in una prima fase da evidenti alterazioni comportamentali: gli animali divengono infatti aggressivi e si osservano spesso ipersalivazione, polifagia e polidipsia, con blanda reazione a vari stimoli e tendenza a nascondersi. I soggetti colpiti possono altresì presentare il pelo arruffato, sporco, poco curato e uno spiccato *grooming*. Successivamente si manifestano tremori muscolari, midriasi, digrignamento dei denti, difficoltà deambulatoria, atassia a carico degli arti posteriori, ipermetria e iperestesia. La morte sopraggiunge in genere dopo 3-8 settimane nel gatto domestico e dopo 8-10 settimane nel ghepardo.

L'esame istopatologico rivela una diffusa spongiosi a livello della sostanza grigia cerebrale [154], ove risultano gravemente colpiti il corpo genicolato mediale, il talamo, il *gyrus dentatus* dell'ippocampo, il corpo striato e gli

strati profondi della corteccia cerebrale. In tali distretti si possono altresì osservare depositi di PrP<sup>Sc</sup> in forma di placche simil-amiloidi. Nel tronco encefalico la vacuolizzazione può coinvolgere il corpo neuronale, in particolar modo a livello del DMNV, nonché dei nuclei vestibolari del midollo allungato e del nucleo rosso mesencefalico. Si nota infine, una diffusa astrogliosi/astrocitosi. La diagnosi laboratoristica di FSE si basa sulla dimostrazione della PrP<sup>Sc</sup> nel SNC tramite IHC e/o WB: a tal proposito, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata documentata a livello di tessuto cerebrale, retina, nervo ottico, *pars nervosa* della ghiandola pituitaria, gangli trigeminali, plessi dell'ENS (a livello di duodeno e digiuno) e, in minor misura, nella midollare del surrene [87].

### Chronic Wasting Disease dei cervidi

La *Chronic Wasting Disease* (CWD), o Malattia del dimagrimento cronico del cervo, è una malattia neurodegenerativa appartenente al gruppo delle TSE che colpisce alcuni ruminanti selvatici della famiglia *Cervidae*.

Segnalata per la prima volta in Colorado (USA) nel 1967 [230, 232], la malattia, inizialmente correlata alla cattività e associata a carenza nutrizionale e allo stress, è stata riconosciuta come una nuova TSE nel 1978 [230, 232]. Gli ospiti naturali della CWD sono alcuni cervidi, quali il cervo mulo (*Odocoileus hemionus*) e una sua sottospecie, il cervo dalla coda nera (*Odocoileus hemionus columbianus*), nonché il cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) e il cervo delle Montagne Rocciose (*Cervus elaphus nelsoni*, altrimenti detto *wapiti*). Recentemente la malattia è stata anche osservata in un alce a vita libera (*Alces alces shirasi*) [12]. I primi casi di CWD diagnosticati nei cervi selvatici risalgono ai primi anni '80, in un cervo delle Montagne Rocciose (Colorado), mentre quelli osservati in animali mantenuti in cattività sono stati accertati in un cervo proveniente dal Saskatchewan (Canada), nel 1996, e in uno allevato nel South Dakota, nel 1997 [233, 234].

Dal 1983 al 1996, la prevalenza stimata della CWD nelle aree endemiche del Colorado e del Wyoming era inferiore all'1% nel cervo delle Montagne Rocciose e a circa il 2,5% nel cervo mulo, con una frequenza annuale di casi pari allo 0,5-9% [112]. Cervi appartenenti ad allevamenti colpiti da CWD sono stati abbattuti in Colorado, Nebraska e South Dakota nel 2001 [233]. Nel luglio 2004 la CWD è stata rilevata in otto Stati degli USA [27].

La prevalenza dell'infezione negli USA (2005) è molto variabile, potendo risultare pari addirittura al 30% in alcune aree del Colorado [235]; in effetti, sulla base della sorveglianza delle popolazioni di cervidi effettuata dalla *Colorado Division of Wildlife* dal giugno 2006 al 2009, si evince che gli alti tassi di trasmissibilità dell'infezione, in associazione con l'elevata densità di cervi in alcune zone degli USA [202], rendono difficile il controllo della CWD.



Gli sforzi per contenerla o eradicarla, utilizzando strategie di gestione della fauna selvatica in Colorado, si sono dimostrati infruttuosi [37]. Attualmente la presenza di CWD è stata dimostrata in cervidi selvatici e di allevamento in quindici Stati del Nord America; tuttavia, l'individuazione della comparsa della CWD in nuovi territori può essere dovuta, almeno in parte, a una più efficace e capillare attività di sorveglianza e/o alla diffusione dell'infezione attraverso migrazioni naturali e/o spostamenti di cervidi infetti da parte dell'uomo.

All'interno delle aree endemiche, inoltre, la stragrande maggioranza dei casi positivi rilevati nei cervi nel corso delle attività di sorveglianza sono subclinici (> 97%). È piuttosto raro, infatti, osservare animali clinicamente affetti, persino all'interno di queste aree; solo in un terzo o al massimo nella metà dei sospetti clinici, inoltre, le indagini laboratoristiche hanno consentito di raggiungere una diagnosi di certezza di CWD. Tuttavia, molti aspetti rimangono ancora da chiarire, in particolare per quanto riguarda le origini e le modalità di trasmissione dell'infezione, così come l'eventuale esistenza di ceppi diversi e le potenziali fonti di rischio per altri animali o per l'uomo.

La CWD sembra presentare a oggi un potenziale rischio zoonosico molto basso [16,109,176, 204], anche se non sono del tutto chiare l'origine, l'esistenza di ceppi diversi di agente, la sensibilità/resistenza genetica degli individui e le modalità di trasmissione dell'infezione.

Infatti, l'origine della CWD non è nota, sebbene possa essere collegata alla trasmissione dell'agente patogeno da allevamenti infetti per contatto accidentale con i cervidi selvatici o, *ex novo*, da una forma sporadica della malattia presente in animali a vita libera [27,103,137,199].

La diffusione dell'agente della CWD avviene attraverso feci, urina, saliva, sangue e velluto dei palchi provenienti da animali infetti, anche durante la fase preclinica dell'infezione [68, 136,199], rendendo in tal modo difficile il contenimento dell'infettività presente nell'ambiente. La comparsa della vCJD in seguito all'esposizione umana all'agente della BSE [33, 88] ha posto interrogativi importanti anche riguardo alla possibilità di trasmissione dell'agente della CWD all'uomo, soprattutto in considerazione del fatto che in Nord America migliaia di cervi vengono cacciati ogni anno e che non è attualmente obbligatorio sottoporre a indagini diagnostiche questi animali (salvo alcune deroghe in vigore nei diversi Stati). A ciò bisogna aggiungere che tessuti quali muscolo scheletrico, cuore e grasso [9,168], oltre a SLR, sistema nervoso centrale e periferico, possono albergare consistenti livelli di infettività costituendo in tal modo un serio elemento di pericolo in ambito di sanità pubblica nel caso in cui venisse dimostrato il potenziale zoonosico dell'agente di malattia.

La CWD, apparentemente limitata agli Stati Uniti e al Canada fino al 2000, ha destato ulteriore attenzione nel

2001, quando è stata diagnosticata in Corea in un cervo importato nel 1997 dal Canada [106, 195].

La sorveglianza sanitaria effettuata in Nord America ha rilevato una diffusione crescente dell'infezione, mentre in Europa non è mai stato diagnosticato alcun caso. Tuttavia, in un parere dell'EFSA del 2010, il Gruppo di Esperti Scientifici sui Pericoli Biologici (BIOHAZ) ha concluso che il verificarsi di casi di TSE in aree geograficamente remote e non accessibili non può essere escluso nei cervidi presenti nel territorio dell'Unione Europea [52].

Proprio quest'ultimo aspetto riveste una particolare importanza anche in considerazione del fatto che una correlazione fra la CWD e alcune forme di CJD dell'uomo, non è ancora stata esclusa.

#### Eziopatogenesi e aspetti epidemiologici

La CWD si verifica tra due popolazioni molto diverse di animali: cervidi allevati e gestiti nelle aziende, alla stessa stregua di altri ruminanti, e popolazioni che vivono in libertà, quasi totalmente fuori dal controllo umano. Capire le differenze inerenti l'epidemiologia, le modalità di trasmissione e la sorveglianza della malattia è indispensabile per cercare di combatterla o prevenirla.

La CWD ha molte caratteristiche in comune con la Scrapie, compresa la diffusa colonizzazione operata dall'agente causale nei confronti dei tessuti nervosi periferici e di numerosi distretti dell'SLR, con il successivo coinvolgimento del SNC [191]. Questa distribuzione dell'infettività alimenta verosimilmente la trasmissione orizzontale dell'infezione, che differisce pertanto in maniera sostanziale dalla BSE [235]. Le caratteristiche clinico-patologiche della



Cervo dalla coda bianca



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

CWD sono simili a quelle delle altre TSE: microscopicamente sono presenti lesioni spongiformi nel SNC, mentre i primi sintomi neurologici compaiono dopo un lungo periodo di incubazione, con un decorso clinico della malattia piuttosto variabile. Durante il periodo di incubazione, la presenza di depositi di PrP<sup>Sc</sup> può essere dimostrata in una serie di tessuti periferici dell'ospite mediante l'utilizzo di anticorpi anti-PrP, spesso con notevole anticipo rispetto alla comparsa dei sintomi clinici. Anche se la CWD può essere trasmessa a bovini [76, 78], ovini [77] e caprini [232] per via intracerebrale, l'infezione per via orale non è risultata parimenti efficiente. L'origine della CWD non è nota e non può essere determinata utilizzando le tecniche di indagine attualmente disponibili [137]; tuttavia, sono state formulate al riguardo le tre seguenti ipotesi:

- derivazione dalla Scrapie;
- origine da una mutazione spontanea, genetica o epigenetica, causante un'alterazione conformazionale della PrP<sup>C</sup> nel cervo mulo;
- derivazione da un ceppo prionico e/o da una fonte sconosciuti [137, 174, 233, 234].

Per quanto concerne la prima ipotesi, pecore e capre sono state occasionalmente allevate presso le zone in cui la CWD è stata descritta. In proposito, i casi di Scrapie ovina erano rari in Colorado e in Wyoming prima del 1980 (tranne una sola eccezione nel primo caso e due nel secondo, tra il 1947 e il 1977) e tutti si sono verificati nelle contee che ora sono distanti dall'area geografica in cui la CWD è endemica [89]. È probabile, tuttavia, che la prevalenza della Scrapie sia stata sottovalutata e sottostimata negli Stati Uniti in quel periodo [232]. A ciò si aggiunge il fatto che i cervidi selvatici, in estate, condividono il pascolo con le pecore e che, in inverno, si alimentano con fieno destinato al bestiame domestico [122]. A sostegno di questa teoria, si deve osservare che in corso di Scrapie sperimentalmente trasmessa a *Cervus elaphus nelsoni* per via intracerebrale, si evidenziano lesioni encefaliche indistinguibili da quelle presenti in corso di CWD [74, 75]; altri studi hanno documentato una discreta capacità della PrP<sup>Sc</sup> di cervidi di trasformare la PrP<sup>C</sup> ovina nella relativa isoforma patologica [170]; inoltre, dal confronto delle glicoforiche di PrP<sup>Sc</sup> di pecore affette da Scrapie e di cervidi affetti da CWD, si rileva una generale somiglianza [167]. Tuttavia, la CWD risulterebbe diversa da qualsiasi caso di Scrapie finora caratterizzato in modelli murini [33, 34, 112], pur risultando trasmissibile ai procioni (*Procyon lotor*) al pari della Scrapie [74]; inoltre, il periodo di incubazione in una capra inoculata con l'agente della CWD per via intracerebrale è risultato più lungo (6 anni) di quello descritto per la Scrapie [232].

La seconda ipotesi contempla una mutazione spontanea del gene *Prnp* nel cervo mulo, seguita dalla trasmissione dell'infezione al *wapiti* e al cervo dalla coda bianca [174, 234], oppure in alternativa una mutazione post-traslazionale della PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>, cui sarebbe conseguita la

diffusione dell'infezione [174, 233]. Sebbene una mutazione spontanea sarebbe teoricamente possibile, come già peraltro suggerito anche nella CJD sporadica dell'uomo [162, 165], una siffatta evenienza risulterebbe estremamente difficile, se non addirittura impossibile da dimostrare nei cervidi.

La terza ipotesi circa l'origine della CWD, infine, è che la stessa possa essere conseguita a un'infezione sostenuta da un ceppo di TSE sconosciuto a sua volta originatosi da una fonte ignota [174, 233, 234]. Non vi sono dati per supportare o rifiutare questa ipotesi, come del resto non vi sono teorie che escludano una fonte umana all'origine dell'infezione.

L'origine della CWD sarebbe maggiormente compatibile con l'esistenza di un unico ceppo di agente, che avrebbe avuto la propria origine nel cervo mulo e che si sarebbe quindi trasmesso ai cervi delle Montagne Rocciose e ai cervi dalla coda bianca [232]. La spiegazione sarebbe da ricercare nel fatto che la malattia è stata riconosciuta come una ben precisa sindrome neurologica nel cervo mulo molti anni prima di essere rilevata in altri cervidi. Il primo caso di CWD in un cervo dalla coda bianca è stato infatti descritto in un animale a vita libera che conviveva simpativamente con un cervo mulo affetto dalla malattia: la relativa diagnosi è stata effettuata solo istologicamente, poiché l'IHC non era ancora disponibile.

Per quanto riguarda invece la possibilità di una trasmissione per via alimentare dell'agente infettivo, sulla base dei dati disponibili si evince che, fatta eccezione per il latte utilizzato a scopo alimentare, nessuna matrice proteica animale è stata somministrata ai cervi mantenuti in cattività in Colorado e nel Wyoming [232].

Anche se non sono note le precise dinamiche di trasmissione della CWD, la trasmissione per via orizzontale sembra essere quella più importante [137]. Le indagini epidemiologiche hanno suggerito che, oltre alla trasmissione all'interno di ciascuna specie, la CWD può essere trasmessa dal *wapiti* al cervo mulo e al cervo dalla coda bianca [232]. La trasmissione verticale, qualora presente, non sembra giocare un ruolo significativo nell'epidemiologia dell'infezione [137]; diversamente dalla Scrapie, infatti, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> non è stata identificata in placente di cervidi. Tuttavia, un modello matematico inerente la trasmissione della CWD non ha potuto escludere una componente materna che comunque, da sola, non avrebbe permesso all'infezione di persistere [135].

Poiché gli agenti delle TSE sono molto resistenti nell'ambiente, la trasmissione indiretta dell'infezione può avvenire tramite contaminazione ambientale [233]; ciò è stato dimostrato sperimentalmente [138] e sembra giocare un ruolo importante nel mantenimento dell'infezione, almeno in popolazioni in cattività, come indicato dal ripetersi di casi di CWD in situazioni di spopolamento completo e ripopolamento successivo, anche quando quest'ultimo è





stato effettuato con un gruppo esente da CWD [238]. Il ruolo della contaminazione ambientale nel mantenimento del ciclo dell'infezione non è del tutto compreso, sebbene alcuni studi abbiano dimostrato che l'infettività permarrrebbe per diversi anni nei pascoli. L'extrapolazione dei dati epidemiologici a situazioni di campo dovrebbe essere tuttavia fatta con cura, suggerendo cautela nella gestione di pascoli o recinti che hanno ospitato cervidi con CWD. Tale considerazione fonda la sua fondamentale premessa sulla trasmissione dell'infezione, che sarebbe principalmente associata agli spostamenti di animali vivi [27, 70, 135, 175, 233].

Il comportamento sociale dei cervi in inverno (spostamento verso zone più basse, meno innevate), inoltre, può concentrare le popolazioni e aumentare la possibilità che la trasmissione orizzontale dell'infezione si verifichi, direttamente o indirettamente [17]. Inoltre, la trasmissione orizzontale può risultare accresciuta quando gli animali si riuniscono per alimentarsi nei siti di pasturazione artificiale [17, 27, 137, 214, 233]: in tali contesti, infatti, gli animali possono rilasciare secrezioni infette, sia salivari sia nasali. In aggiunta, si è osservato che alcuni cervi mulo hanno contratto l'infezione per contatto con residui scheletrici e altri tessuti di cervi infetti, attraverso il terreno e la vegetazione circostanti [137, 138a]. Per contro, da indagini effettuate su campioni d'acqua provenienti da aree endemiche, sono stati riscontrati livelli di PrP<sup>Sc</sup> inferiori a quelli ritenuti sufficienti per trasmettere l'infezione [143]. Inoltre, sebbene non siano ancora disponibili dati sufficienti al riguardo, la possibilità di un "reservoir" vertebrato non identificato dovrebbe essere quantomeno presa in considerazione [174]. Un recente studio effettuato su gatti domestici sperimentalmente esposti all'agente della CWD ha dimostrato che l'infezione può essere trasmessa anche a questa specie, sollevando preoccupazioni circa l'eventuale diffusione della stessa ai felidi selvatici [131]. Va parimenti ricordato che le modalità di eliminazione dell'agente eziologico a opera degli animali infetti risultano in larga parte sconosciute e non si sa quanto tempo dopo l'infezione questo venga eliminato, né tantomeno la dose minima infettante [39]. Sembra tuttavia probabile che l'eliminazione dell'agente sia progressiva in corso di infezione e che la stessa inizi prima della comparsa dei segni clinici [27, 214, 232]. Le più probabili vie di eliminazione del prione della CWD sarebbero da ricercare nella saliva, nell'urina e nelle feci [27, 73, 136], mentre i tessuti che mostrano depositi di PrP<sup>Sc</sup> mediante IHC sono il SNC e vari distretti dell'SLR; solo raramente nei cervidi è stata documentata la presenza di PrP<sup>Sc</sup> nel cervello senza contestuale deposizione nei tessuti linfatici [199]. Analogamente alla Scrapie, anche nei cervi la PrP<sup>Sc</sup> si accumula nei linfonodi retrofaringei e nelle tonsille palatine prima che si realizzi il coinvolgimento del SNC e la comparsa della sintomatologia clinica [192, 199]. Indagini *ante mortem* condotte mediante IHC sui predetti distretti

linfoidi forniscono una diagnosi preclinica affidabile [236], per quanto difficoltosa in animali selvatici.

Dal punto di vista patogenetico, un modello simile a quello già descritto in precedenza per la Scrapie sembra verificarsi nei cervidi in corso di CWD, con il precoce coinvolgimento sia delle tonsille palatine sia del tessuto linfatico associato all'intestino (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT). A tal proposito, la presenza di infettività nella saliva [72, 73, 129, 139b] suggerirebbe una migrazione centrifuga/retrograda neurotrofa dell'agente infettivo fino alla mucosa orale o nasale (PrP<sup>Sc</sup> inoculata tramite aerosol in cervi dalla coda bianca mostrerebbe un maggior potenziale di diffusione rispetto alla via orale; [41]), oppure una colonizzazione successiva al trasporto operato da cellule linfoidi provenienti dal GALT. In un esperimento condotto nel 2011 su animali esposti all'agente della CWD attraverso diverse vie di inoculazione, è stata evidenziata tramite PMCA (*protein misfolding cyclic amplification*) la presenza di PrP<sup>Sc</sup> nella saliva [73, 205]. Ciò dimostra la possibilità di trasmissione dell'infezione attraverso interazioni tra animali, sorgenti d'acqua condivise e punti di alimentazione comuni, soprattutto in situazioni ad alta densità di cervidi, come avviene ad esempio durante la stagione riproduttiva, nei siti di adescamento, in cattività e nelle fasi di bassa predazione. Un altro recente studio condotto su esemplari di *Cervus elaphus nelsoni* [201] ha documentato la presenza di depositi di PrP<sup>Sc</sup> dapprima al livello del nervo ottico e nel chiasma ottico e, successivamente, nella retina (strato plessiforme interno ed esterno). Il prione, in seguito, diffonderebbe verso tutti i rimanenti strati retinici, risparmiando lo strato epiteliale pigmentato. Probabilmente l'accumulo di PrP<sup>Sc</sup> all'interno della retina, con degenerazione dei neuroni dello strato delle cellule gangliari e dei nuclei delle vie ottiche cerebrali, spiega le disfunzioni visive osservate nei cervi nelle ultime fasi di vita.

Per quanto riguarda invece la possibilità di reperire la PrP<sup>Sc</sup> a livello dei muscoli scheletrici, uno studio di Hamir *et al.* [75] sembra confutarne la presenza. In effetti, a seguito di infezione sperimentale per via intracerebrale su ovini, bovini, alci e procioni, questi non hanno mostrato presenza di infettività nei muscoli della lingua, né tantomeno a livello dei muscoli masseteri, del diaframma e del cuore, mettendo così in discussione altri precedenti lavori [19, 28, 209]. Ciò nonostante, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata dimostrata nel tessuto muscolare di topi transgenici [9] e nel miocardio di cervi infettati sperimentalmente [96]. A questo, che già di per sé potrebbe costituire un serio problema in ambito di sanità pubblica, deve aggiungersi il fatto che nel 2008, a seguito di ulteriori studi su topi transgenici sperimentalmente infettati con Scrapie e CWD, è stata dimostrata la presenza di PrP<sup>Sc</sup> anche nel tessuto adiposo [168]. Alcune indagini hanno altresì rilevato infettività prionica nel sangue di ovini sperimentalmente infettati con l'agente della Scrapie e della BSE prima della comparsa dei





## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

sintomi clinici [90] e ciò è stato anche dimostrato in pazienti umani con vCJD. [65, 239]. Inoltre, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata evidenziata nel sangue di cervi inoculati con omogenati di tessuto cerebrale, urina, saliva, sangue e feci di animali CWD-infetti [129, 130].

Alla luce di quanto sopra, appare importante sottolineare che nessun tessuto proveniente da cervidi malati possa essere considerato privo di infettività e che, unitamente alla diffusione per via linfo-ematogena dell'infezione, vettori invertebrati possano svolgere un ruolo epidemiologico nella trasmissione della stessa. Una menzione particolare meritano gli studi nei quali è stato dimostrato come particolari tipologie di flogosi croniche, quali la nefrite linfocitaria nei topi o le mastiti linfoproliferative croniche a eziologia lentivirale nei piccoli ruminanti (ovini), siano in grado di aumentare il *range* di tessuti in cui si deposita la PrP<sup>Sc</sup>, permettendo in tal modo la colonizzazione di distretti dell'ospite in cui normalmente non risiederebbe l'infettività: questo sembra essere legato primariamente a una serie di molecole e di cellule immunologicamente attive che sarebbero necessarie per la replicazione prionica a livello dei suddetti focolai flogistici linfoproliferativi [85]. A tal proposito, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata documentata a livello di fegato, reni e pancreas di topi con infiammazioni croniche linfocitarie e sperimentalmente infettati con l'agente della Scrapie; analoghi risultati sono stati ottenuti anche in focolai di mastite linfoproliferativa osservati in ovini naturalmente coinfectati sia dal virus della Visna-Maedi sia dall'agente della Scrapie [116]. Questi importanti quanto intriganti dati hanno giustificato la preoccupazione che fenomeni analoghi possano verificarsi anche nei cervidi in natura. In questi animali, infatti, non appare infrequente il riscontro di casi di enteropatie infiammatorie croniche a eziologia parassitaria (strongilosi gastrointestinali) o batterica (paratubercolosi), che potrebbero a loro volta giocare un ruolo sinergico nella replicazione prionica e nella conseguente escrezione fecale dell'agente infettivo [47].

Interessante anche un'indagine condotta sul velluto di palchi di cervi affetti da CWD, in cui è stata dimostrata la presenza di PrP<sup>Sc</sup>. I palchi, infatti, sono ricchi di vasi sanguigni e terminazioni nervose e, essendo rinnovati ogni anno, possono rappresentare una potenziale fonte di infezione. Al riguardo, omogenati tessutali provenienti dal velluto sono stati inoculati per via intracerebrale in topi geneticamente suscettibili alla CWD: questi hanno sviluppato una TSE [10] e, mediante IHC e PMCA, sono stati rilevati depositi di PrP<sup>Sc</sup> nel loro tessuto cerebrale. Tale studio ha dimostrato che il velluto di cervi con CWD alberga infettività, che potrebbe a sua volta rappresentare una fonte di pericolo per altri cervidi e per l'uomo, in quanto il velluto viene utilizzato da secoli come integratore vitaminico soprattutto dalla medicina tradizionale cinese, coreana e giapponese.

Per quanto riguarda la suscettibilità genetica dei cervidi

nei confronti della CWD, gli studi sono tuttora in corso e potrebbero fornire una serie di dati importanti per il controllo della malattia, almeno negli Stati Uniti: come dimostrato in altre specie sensibili alle TSE, infatti, la suscettibilità alla CWD dipende in larga misura dai polimorfismi presenti nel gene *Prnp*. A tal proposito, nel cervo mulo, i polimorfismi presenti a livello del codone 225, che codifica per la serina (S) o la fenilalanina (F), influenzano la suscettibilità alla CWD: una prevalenza della CWD 30 volte maggiore è stata infatti documentata in animali omozigoti per la serina in posizione 225 rispetto agli animali eterozigoti, nei quali il tempo di incubazione è risultato ben più lungo. Polimorfismi ai codoni 95 [glutamina (Q) o istidina (H)], 96 [Glicina (G) o serina (S)] [98] e 116 [alanina (A) o glicina (G)] [83] sono stati altresì segnalati nel cervo a coda bianca. Il genotipo QGA è più frequente nei cervidi affetti da malattia rispetto al QSA [97, 149]. Il cervo delle Montagne Rocciose, invece, presenta una sequenza codificante che è polimorfa in corrispondenza del codone 132 [metionina (M) o leucina (L)] [146, 181]. A tal proposito, studi sperimentali [77, 150] indicano che i genotipi con gli alleli 132LL e 132 ML sarebbero più resistenti nei confronti della CWD, mentre gli individui 132 MM omozigoti sarebbero più suscettibili nei confronti dell'infezione prionica [63]. Sebbene nessun genotipo sia in grado di fornire resistenza completa alla CWD, qualora il periodo di incubazione e la patogenesi dell'infezione ne risultassero significativamente influenzati, come avviene nella Scrapie ovina, ciò potrebbe avere importanti implicazioni per lo sviluppo di strategie di gestione sanitaria e di controllo dell'infezione e della malattia.

### Caratteristiche cliniche

A causa del lungo periodo di incubazione, che nella malattia naturale è di circa 16 mesi, nei giovani animali la CWD non si evidenzia in genere in forma clinicamente manifesta. Il periodo di incubazione, difficile da determinare nei cervidi a vita libera, può variare dai 2 ai 4 anni. Ciononostante, la CWD è stata diagnosticata in un *wapiti* di 15 anni, in un cervo mulo di 12 e in alcuni cervi dalla coda bianca di 5 anni residenti in allevamenti in cui la malattia era endemica. Questi individui potrebbero aver sviluppato la malattia dopo essere stati esposti all'agente della CWD da adulti, o potrebbero altresì suggerire l'esistenza di periodi di incubazione prolungati. L'influenza esercitata dalla dose infettante non è chiara, sebbene le osservazioni preliminari condotte su cervi in cattività sia sperimentalmente sia naturalmente infettati suggeriscono che, più alte sono le dosi infettanti, più breve è il periodo di incubazione. La durata della malattia, estremamente variabile, potrebbe in parte riflettere le difficoltà nel determinarne l'esordio clinico. La stessa può durare da un paio di settimane ad alcuni mesi: da due a otto mesi nel cervo mulo, da uno a dodici mesi nel *wapiti*. Generalmente la morte si verifica entro 4 mesi, sebbene l'*exitus* risulti più precoce in animali





a vita libera. Occasionalmente nei cervi dalla coda bianca si verificano casi di morte improvvisa. Le manifestazioni cliniche includono un'importante perdita di peso nel corso di settimane o mesi, unitamente ad alterazioni del comportamento, salivazione eccessiva, difficoltà a deglutire, polidipsia e poliuria (associate a danni a carico dei nuclei sopraottico e paraventricolare ipotalamici, con conseguente insorgenza di diabete insipido). In alcuni animali si possono altresì osservare atassia e tremori della testa, mentre la morte spesso sopraggiunge a causa di una polmonite *ab ingestis* secondaria alla scialorrea e al rigurgito (probabilmente dovuti a un danno neurologico centrale). Un'altra caratteristica saliente negli adulti è rappresentata dai disturbi comportamentali, che tipicamente impiegano settimane o mesi per verificarsi. Oltre a queste caratteristiche generali non specifiche, possono essere presenti ulteriori segni quali lesioni buccali, scialorrea, tremori della testa e megaesofago. Le alterazioni comportamentali e neurologiche possono altresì includere polidipsia e poliuria, sincope, sguardo fisso, variazioni nelle dinamiche di interazione con il resto del gruppo, stazione e postura alterate, spesso con portamento della testa in basso, nonché ipereccitabilità. Il prurito con perdita di vello rappresenta una manifestazione clinica comunemente osservata nelle fasi terminali della Scrapie ovina, sebbene ciò non trovi riscontro nella CWD; tuttavia, il pelo di animali affetti può essere ruvido e secco con ritenzione di chiazze di mantello invernale durante la stagione estiva. Con la sola eccezione del basso peso specifico delle urine, che si rinviene nello stadio terminale della malattia, la biochimica clinica e l'ematologia non sono utili ai fini della diagnosi. La possibilità di rilevare i primi segni clinici richiederebbe una notevole familiarità con il singolo animale; questo non è possibile in molte situazioni di allevamento ed è praticamente impossibile nei cervidi selvatici.

La stagionalità non è una caratteristica significativa: gli animali possono sviluppare CWD clinicamente manifesta in qualsiasi momento dell'anno; tuttavia, in alcuni gruppi, gli animali più colpiti sono segnalati in autunno o in inverno, forse in seguito all'aumento dello stress ambientale. Le caratteristiche epidemiologiche dell'infezione dovrebbero essere adeguatamente considerate nell'ambito delle indagini su casi di sospetta CWD. In allevamenti naturalmente infetti da CWD, inoltre, non si osserva in genere più di un animale con sintomatologia clinica.

#### Caratteristiche neuro-istopatologiche

Le lesioni caratterizzanti la CWD sono simili a quelle che si osservano negli altri ruminanti colpiti da TSE: a tal proposito, le tipiche lesioni a carattere spongiforme sono osservabili solo a livello della sostanza grigia del SNC. Le suddette lesioni sono simmetriche e bilaterali, con contestuale presenza di vacuolizzazione e degenerazione/necrosi neuronale e astrocitosi/astrogliosi, queste ultime non particolarmente rilevanti. I principali distretti colpiti dalle suddette lesioni risultano essere diencefalo, corteccia olfattoria, nuclei del midollo allungato, DMNV *in primis*, nonché midollo spinale [157]. Scarsamente coinvolti sono i nuclei basali, la corteccia cerebrale e l'ippocampo [199,232]. Depositi di PrP<sup>Sc</sup> in forma di placche amiloidi sono relativamente frequenti e possono essere rilevati in sezioni di tessuto cerebrale, con frequenza decrescente nel cervo dalla coda bianca, nel cervo mulo, e nel *wapiti*. Queste risultano morfologicamente compatibili con le c.d. "placche floride" già descritte in precedenza in pazienti affetti da vCJD. Prima dell'avvento dell'IHC, l'esame istologico della regione dell'*obex* era considerato la metodica d'elezione per formulare una diagnosi di CWD.



Cervo mulo





## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

### Diagnosi

Le indagini istopatologiche sono molto utili ai fini della diagnosi di CWD in animali con sintomatologia clinica; tuttavia, la diagnosi di certezza può essere ottenuta grazie all'impiego dell'IHC su sezioni di tessuti precedentemente fissati in formalina e inclusi in paraffina. In cervidi appartenenti al genere *Odocoileus*, la biopsia tonsillare e dei linfonodi retrofaringei può altresì costituire un valido ausilio ai fini della diagnosi *intra vitam* di CWD tramite IHC [136,199], poiché questi tessuti sono precocemente colonizzati in corso di infezione (in *Cervus elaphus nelsoni*, invece, gli stessi tessuti possono essere coinvolti in maniera intermittente). Anche frammenti bioptici provenienti dalla terza palpebra possono essere utilizzati a tal fine, sebbene tale approccio non sia consigliabile in *Cervus elaphus nelsoni*, a causa della ridotta quantità di tessuto linfoide presente in tali distretti. Sarebbe pertanto preferibile associare a questi distretti, in animali morti, anche l'analisi dell'*obex*, poiché il mancato rilevamento di PrP<sup>Sc</sup> in tonsille e linfonodi retrofaringei non consentirebbe di escludere in maniera categorica la presenza di CWD [136, 175] e un risultato negativo può verificarsi in corso di infezione recente. Sempre in termini di diagnosi *intra vitam*, la presenza di PrP<sup>Sc</sup> è stata recentemente dimostrata tramite PMCA nel liquido cefalo-rachidiano di un esemplare di *Cervus elaphus nelsoni* affetto da CWD (seppure nelle fasi avanzate della malattia; [144]). L'IHC rimane comunque la metodica diagnostica di riferimento (*gold standard*), risultando peraltro assai utile per identificare depositi PrP<sup>Sc</sup> a livello di vari distretti linfatici, nonché di milza, retina ed ENS. Anche la tecnica del WB, effettuata su tessuto cerebrale fresco o congelato, è molto utilizzata ai fini della diagnosi di CWD.

### Sorveglianza sanitaria

Il documentato potenziale zoonosico della BSE ha suscitato molte preoccupazioni circa la trasmissione della CWD all'uomo. Come già evidenziato in precedenza, infatti, la PrP<sup>Sc</sup> sarebbe presente nei cervidi CWD-infetti a livello di muscolo scheletrico, grasso, SLR, velluto, distretti nervosi periferici e SNC. Pertanto, la possibilità di esposizione umana all'agente della CWD in seguito alla manipolazione e al consumo di materiale infetto è notevole e aumenta proporzionalmente alla prevalenza dell'infezione. La trasmissione interspecifica dei prioni è spesso limitata, come già accennato in precedenza, dalla c.d. "barriera di trasmissione": la diffusione interspecifica risulta pertanto assai meno efficiente rispetto a quella intraspecifica, il che sembra dovuto a differenze nella struttura primaria della PrP<sup>C</sup> tra ospite "donatore" e ospite "ricevente". Anche il ceppo prionico e la via di inoculazione/infezione possono svolgere un ruolo in tal senso: ad esempio, la trasmissione per via intracerebrale risulta spesso ben più efficace di quella *per os*. Molti studi indicano inoltre un basso rischio di trasmissione della CWD all'uomo, mentre

una siffatta evenienza non è stata finora documentata attraverso i correnti programmi di sorveglianza nei confronti dell'infezione. Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato una ridotta efficienza di conversione della PrP<sup>C</sup> umana in PrP<sup>Sc</sup> a seguito di infezione sperimentale con l'agente della CWD in topi transgenici [16]; inoltre, topi transgenici esprimanti PrP<sup>C</sup> umana si sono rivelati resistenti nei confronti della CWD [176]. Tuttavia, scimmie scoiattolo (*Saimiri sciureus*) si sono rivelate suscettibili alla CWD a seguito di infezione per via intracerebrale e orale, mentre macachi *cynomolgus*, evolutivamente più vicini agli esseri umani, si sono dimostrati resistenti [169]. Indipendentemente da ciò, che un primate sia suscettibile all'agente della CWD in seguito a infezione *per os* è già di per sé motivo di preoccupazione. In condizioni naturali, la trasmissione dell'infezione non è stata osservata nel procione, nell'opossum e nel coyote (carnivori che hanno l'abitudine di nutrirsi di carogne); tuttavia, è stata documentata la trasmissione sperimentale alla pecora, alla capra, al furetto, al visone, all'arvicola e al topo [42, 74, 156, 192]. La trasmissione della stessa è stata altresì dimostrata in alcune specie della famiglia *Cervidae*, come renna (*Rangifer tarandus tarandus*; [140]), cervo rosso europeo (*Cervus elaphus elaphus*; [13]) e daino (*Dama dama*; [79, 80]).

Vi sono diverse ragioni che inducono cautela riguardo le possibilità di trasmissione dell'infezione: infatti, diversi ceppi di agente della CWD si distinguono per periodo di incubazione, fenotipo clinico-patologico e conformazione nonché topografia dei depositi di PrP<sup>Sc</sup> nel SNC. Studi di trasmissione inter/intraspecifica hanno condotto all'individuazione di due ceppi di CWD in adeguati modelli murini [11], indicando la probabile esistenza in natura di diversi ceppi di agente circolanti tra i cervidi. Tuttavia, nulla è attualmente conosciuto sulla distribuzione naturale e sulla prevalenza di tali ceppi; inoltre, le differenze esistenti fra i determinanti biologici che modulano la suscettibilità/resistenza genetica dell'ospite nei cervidi e nell'uomo rendono ulteriormente complicata la possibilità di dimostrare in maniera conclusiva che l'agente della CWD sia realmente dotato di capacità zoonosica, unitamente al suo potenziale di trasmissione interspecifica. Tramite PMCA si è dimostrato che la PrP<sup>Sc</sup> dei cervidi può indurre la conversione della PrP<sup>C</sup> umana nella sua "controparte" patologica, ma solo dopo che il ceppo di prione utilizzato è stato "stabilizzato" mediante passaggi seriali *in vitro* o *in vivo* [16]. Dato che le TSE possono essere difficili da diagnosticare e che il periodo di incubazione può durare decenni, la continua ricerca, la sorveglianza epidemiologica e la cautela nel maneggiare materiale a rischio potrebbero evitare o ridurre la possibilità che la CWD continui a diffondersi, oltre a diminuire il rischio di trasmissione interspecifica. Per questo motivo, negli Stati Uniti e nel Canada, dove la malattia ogni anno provoca ingenti perdite economiche e desta grande preoccupazione, sono attivi da anni programmi per la sorveglianza e per il



monitoraggio che mirano all'eradicazione della CWD. Una menzione particolare merita anche la Corea, dove la malattia è stata identificata nel 2001.

### Sorveglianza negli Stati Uniti

In concomitanza con le crescenti preoccupazioni circa la CWD, si è verificato un parallelo incremento delle disposizioni che disciplinano la gestione dei cervidi d'allevamento e di quelli a vita libera (*Plan for Assisting States, Federal Agencies, and Tribes in Managing Chronic Wasting Disease in Wild and Captive Cervids*, 2002 [158]; *Multi-State guidelines for CWD in free-ranging white-tailed deer, mule deer, and elk*, 2004 [141]).

La sorveglianza si divide in passiva (comunemente "targeted surveillance") e attiva ("active surveillance"): nella prima rientra il controllo degli animali con sintomi clinici (ogni animale con segni compatibili con la CWD deve essere segnalato all'Autorità competente e sottoposto a test diagnostico per questa malattia), mentre nella seconda rientra il controllo dei cervidi cacciati, investiti, macellati per il consumo umano, morti per cause sconosciute e morti in azienda. Generalmente, le aree sottoposte a misure di sorveglianza più restrittive riguardano quelle adiacenti a zone dove vivono molti cervidi, sia allevati sia selvatici e/o dove la malattia ha un'incidenza e una prevalenza maggiori. Dopo i primi riconoscimenti di CWD all'interno di alcuni allevamenti, Stati, Province e Agenzie federali di polizia sanitaria hanno sviluppato programmi volontari od obbligatori per controllare e gestire la malattia, aventi come obiettivo finale l'eradicazione della CWD da queste aziende. Alcuni Stati prevedono il campionamento di tutti i cervidi macellati o morti in azienda, altri solo di quelli con sintomatologia neurologica, mentre l'età degli animali sottoposti ai test diagnostici varia in relazione al territorio considerato. I programmi di monitoraggio si basano sull'identificazione del singolo animale, sul censimento annuale e sul controllo visivo, oltre che sui test diagnostici effettuati sugli animali morti in azienda o al momento della macellazione. La CWD è altresì una malattia soggetta a notifica. Secondo l'USDA (*US Department of Agriculture*) e l'APHIS (*Animal and Plant Health Inspection Service*), per inserire un allevamento nell'HCP (*Herd Certification Program*, attivo dal 2003 [86]) e dichiararlo indenne, è necessario che non si sia manifestato alcun caso di CWD negli ultimi 5 anni. Le aziende che aderiscono a questo programma (iscritte a un *database*, così come tutti gli animali), per mantenere lo *status* devono accettare animali provenienti solo da allevamenti indenni e condurvi un'idonea attività di sorveglianza per almeno 60 mesi. I proprietari devono segnalare tutti i capi con sintomatologia riferibile alla CWD e i morti in allevamento aventi un'età pari o superiore ai 12 mesi, ai quali vengono prelevati *obex* e linfonodi retrofaringei per il test rapido. Sono sottoposti a test diagnostico obbligatorio anche tutti gli animali macellati di età superiore a un anno. Gli ani-

mali destinati alla macellazione devono essere inviati direttamente in uno stabilimento riconosciuto, accompagnati da un certificato veterinario e correttamente identificati. Qualora la CWD venisse identificata tramite indagini laboratoristiche, è previsto l'abbattimento totale (opzione consigliata) o selettivo dei cervidi presenti in azienda. A questo segue l'invio di campioni ai laboratori designati per le indagini diagnostiche del caso. L'azienda viene messa in quarantena e sottoposta a procedure di sanificazione dopo l'abbattimento degli animali. Nel caso di un abbattimento selettivo, tutti gli animali rimasti in azienda, macellati o con sintomatologia neurologica, vengono sottoposti a test diagnostico indipendentemente dall'età. Nessun animale può entrare o uscire dall'azienda. Vengono rintracciati tutti i cervidi che sono entrati nell'allevamento e quelli che ne sono usciti 60 mesi prima dalla diagnosi. Le carcasse infette possono essere incenerite, sotterrate in discariche autorizzate, sottoposte a idrolisi alcalina mediante alta pressione o interrate *in situ* se l'area è dichiarata idonea dai regolamenti statali. I sottoprodotti provenienti da animali infetti sono inceneriti o interrati, mentre l'allevamento è soggetto a disinfezione obbligatoria. La gestione della CWD in cervidi a vita libera varia a seconda dell'ambito territoriale in questione e dell'evoluzione della malattia in quel determinato contesto geografico. La gestione della CWD in aree fortemente endemiche è diversa a seconda degli Stati interessati e può includere la sorveglianza, la prevenzione della diffusione geografica e la diminuzione della prevalenza attraverso la riduzione della popolazione di animali sensibili. La maggior parte degli Stati e delle Province forniscono opportune linee guida per cacciatori in materia di trasporto e manipolazione di tessuti ad alta infettività raccolti da cervi provenienti da aree endemiche, con particolare riferimento al cervello, al cranio e alla colonna vertebrale. Quasi tutte le giurisdizioni consentono solo il trasporto di carni dissate, zucchetti puliti, palchi e pelli.

La sorveglianza attiva viene effettuata a seconda del contesto geografico, del periodo (alcuni programmi di controllo obbligatori sono limitati a certe aree di contenimento durante la stagione di caccia) e, molto spesso, su base volontaria: in alcuni Stati, nessun cacciatore è tenuto a sottoporre *obex* e linfonodi ai test diagnostici, a meno che non esistano specifici regolamenti; tuttavia, lo stesso deve essere formato e provvedere alla rimozione del materiale a rischio (generalmente lasciato sul posto) dalla carcassa prima di movimentarla. L'età degli animali da sottoporre ai test diagnostici varia in base allo Stato e alla giurisdizione (generalmente gli animali aventi un'età superiore ai 12 mesi). I cervidi trovati morti o investiti rientrano automaticamente nel piano di sorveglianza attiva.

Secondo il *Report* finale 2012 dell'OIE, la CWD è stata identificata in Colorado, Illinois, Kansas, Minnesota, Missouri, Nebraska, New Mexico, Stato di New York, North



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

Dakota, South Dakota, Utah, Virginia, West Virginia, Wisconsin e Wyoming. Secondo i dati dell'APHIS sulle malattie della fauna selvatica, per il 2011 un totale di 20.430 cervi d'allevamento sono stati testati ai fini della sorveglianza e due nuove mandrie di animali sono risultate positive, ciascuno con almeno un soggetto CWD-infetto. Nel corso degli ultimi 10 anni, infine, la CWD è stata rilevata in 52 allevamenti in 11 Stati degli USA.

### Sorveglianza in Canada

Programmi di sorveglianza attiva/passiva sugli animali allevati vengono regolarmente condotti dal 2000. Secondo la CFIA (*Canadian Food Inspection Agency*), i cervidi allevati provenienti da Alberta, Manitoba, Yukon e Saskatchewan (aree endemiche), regolarmente macellati e aventi un'età superiore ai 12 mesi, vengono sottoposti obbligatoriamente ai test rapidi (gli altri Stati possono usufruire di questo servizio su base volontaria). I tessuti da sottoporre alle suddette indagini diagnostiche sono l'*obex* (per il cervo rosso e il *wapiti*), nonché i linfonodi retrofaringei (per il cervo mulo, il cervo dalla coda bianca e il cervo dalla coda nera); tuttavia, campioni provenienti dai succitati distretti tissutali devono essere conservati e analizzati per la diagnosi di certezza. Vengono campionati anche gli animali morti in azienda per cause sconosciute, quelli con sintomatologia neurologica riconducibile alla malattia, i macellati d'urgenza e quelli morti durante l'esecuzione di un programma di eradicazione della malattia. Nel caso in cui venisse identificato un animale infetto, l'allevamento è sottoposto a quarantena (anche mangime, fieno e velluto dei palchi non possono essere movimentati), con l'obbligo di abbattimento e prelievo dell'*obex* e dei linfonodi retrofaringei (per la diagnosi) da tutti i cervidi. Gli animali che hanno lasciato la mandria entro 36 mesi dalla diagnosi vengono rintracciati e sottoposti a eutanasia; quelli movimentati tra i 36 e i 60 mesi dopo la diagnosi vengono rintracciati e sottoposti a sorveglianza passiva. L'allevamento dovrà quindi attuare le conseguenti misure di sanificazione. In Canada, per i cervidi allevati o mantenuti in strutture venatorie, esiste un programma volontario di certificazione degli allevamenti (*Voluntary Herd Certification Program*, 2003 [220]) per qualificare l'azienda come esente da CWD. A tale programma possono aderire tutti gli Stati; tuttavia, indipendentemente dall'iscrizione, Alberta, Manitoba, Yukon e Saskatchewan sono obbligati a sottoporre ai test diagnostici rapidi tutti i cervi macellati di età superiore a 12 mesi. Ogni allevamento e ogni animale deve essere identificato dalle Agenzie Federali; l'azienda deve essere costruita in maniera tale da impedire fughe di animali o l'entrata di fauna selvatica all'interno; tutti i documenti, custoditi per almeno 5 anni, devono essere messi a disposizione delle Autorità competenti. Nel caso in cui si rilevasse un animale infetto in un allevamento dichiarato indenne da CWD, si ha l'obbligo di quarantena per gli animali e i prodotti di origine ani-

male; tutti i cervidi vengono macellati (in stabilimenti riconosciuti) e si effettuano test diagnostici su tutti gli animali adulti provenienti dall'azienda. Se la diagnosi di malattia viene confermata mediante IHC in un laboratorio designato dalla CFIA, vengono immediatamente rintracciati gli animali che sono entrati nell'azienda e quelli che sono usciti 60 mesi prima della data della diagnosi o del riscontro della malattia. Nel caso in cui un cervo fuggisse dall'allevamento, il proprietario dovrebbe informare rapidamente l'Autorità competente e, qualora non venisse rintracciato o non rientrasse entro 72 ore, lo stesso verrebbe abbattuto e sottoposto a test diagnostico.

Qualora gli animali fossero stati movimentati dall'allevamento 36 mesi prima della diagnosi di CWD in un soggetto, gli stessi dovranno essere macellati e valutati dal punto di vista diagnostico. Tutti gli animali dell'allevamento d'origine e i loro prodotti sono considerati a rischio di contaminazione: i cervidi sono abbattuti e le carcasse smaltite mediante incenerimento o interrimento profondo in discariche autorizzate. Velluto, sperma ed embrioni provenienti da cervidi CWD-infetti vengono distrutti. L'ubicazione delle fosse comuni richiede l'approvazione da parte delle Autorità di tutela ambientale. L'allevamento verrà quindi sottoposto a disinfezione. Per quanto riguarda i programmi di sorveglianza sui cervidi selvatici, questi si basano sugli animali uccisi dai cacciatori, i quali sono tenuti a conservarne la testa per i relativi accertamenti diagnostici (animali di età superiore a un anno). Più precisamente, in Alberta, Saskatchewan e Manitoba (pur non essendo la malattia presente in quest'ultima provincia) sono obbligatori ai fini diagnostici, campionamenti di teste di animali provenienti solo da alcune aree geografiche, che sono comunque incoraggiati nelle altre; i cacciatori hanno a disposizione appositi *kit* per conservare i campioni, mentre alcuni congelatori sono ubicati nelle zone circostanti. Targhette per identificare l'animale, le zone di caccia e i cacciatori devono essere adeguatamente compilate. In Yukon è obbligatorio sottoporre alle indagini diagnostiche tutti i cervidi cacciati, mentre in Ontario e British Columbia i cacciatori possono volontariamente e gratuitamente sottoporre ai test diagnostici gli animali. Non è possibile, infine, movimentare carcasse o parti di carcassa contenenti organi potenzialmente infetti (tonsille, linfonodi, midollo spinale, ossa) da una zona all'altra senza preventiva autorizzazione.

### Sorveglianza in Corea

La CWD è stata identificata nel 2001 in un'azienda a Chungbuk, in Corea del Sud [29,195]. L'infezione, secondo informazioni rilasciate dal Governo Canadese nel 2000, sarebbe stata messa in relazione ad esportazioni di animali eseguite nel 1994 e nel 1997 da alcuni allevamenti canadesi dove in seguito la CWD è stata diagnosticata. Nove cervi sono risultati positivi ai test diagnostici per la malattia. La Corea ha temporaneamente vietato l'impor-



tazione di cervi vivi, caprioli e svariati prodotti di origine animale, tra cui il velluto, dagli Stati Uniti e dal Canada, il 28 dicembre 2000. Nel 2001 il MAF (*Ministry of Agriculture and Forestry*) ha iniziato un programma di sorveglianza sugli allevamenti di cervi. Tutti i cervi importati nel 1997 sono stati rintracciati, identificati e sottoposti a test diagnostici, indipendentemente dalla presenza di sintomi neurologici. Adeguate misure di controllo sono state intraprese, compresi l'abbattimento di tutti gli animali dell'azienda colpita e un'accurata pulizia e disinfezione dei locali. Inoltre, a livello nazionale è stato adottato un programma di sorveglianza passiva sui cervidi coreani e sono state attuate misure più efficaci per garantire la segnalazione dei casi sospetti [195]. Un ulteriore caso di CWD è stato diagnosticato nel 2004 [106]; tutti gli animali dell'allevamento sono stati abbattuti. Nel luglio 2010 un cervo proveniente da un'azienda è stato dichiarato positivo nei confronti dell'infezione; dopo i test di *routine*, tutti gli animali sono stati abbattuti, compresi quelli che vivevano in allevamenti epidemiologicamente correlati alla suddetta azienda [196]. Il piano di sorveglianza attiva/passiva è ancora in fase di attuazione.

### Sorveglianza in Europa

In seguito all'epidemia di BSE e al probabile ruolo del consumo di carne proveniente da bovini infetti nell'epidemiologia della vCJD, l'attenzione della Comunità scientifica si è focalizzata sulla possibilità di trasmissione degli agenti delle TSE animali all'uomo. Nella fattispecie, il Regolamento 999/01/CE prende in considerazione le TSE in base al rischio per la salute umana e animale; viene altresì incoraggiata l'adozione di norme aggiuntive nei confronti della sorveglianza, della prevenzione e dell'eradicazione delle TSE, incentivando la possibilità da parte degli Stati Membri di notificare TSE emergenti, diverse dalla BSE o dalla Scrapie, nonché di stabilire appositi piani di emergenza o di *screening*. Non vi è parimenti un esplicito riferimento alla CWD per quel che concerne la sorveglianza e le misure di eradicazione, sebbene nell'Allegato XI (poi soppresso dal Regolamento 722/2007/CE e annesso all'Allegato IX) essa sia contemplata in riferimento alle importazioni di carni di cervidi (carni fresche, preparazioni di carne, prodotti a base di carne) dagli Stati Uniti e dal Canada. Le carni provenienti da selvaggina d'allevamento o selvaggina in libertà (escluso il midollo spinale e le frattaglie) devono essere accompagnate da un idoneo certificato sanitario nel quale si attesti che, mediante appropriate indagini istologiche, immunoistochimiche o immunobiochimiche, l'animale è stato dichiarato negativo nei confronti della CWD e che non proviene da una mandria nella quale sia stata confermata o si sospetti la malattia (per i cervi allevati), o da una regione nella quale sia stata confermata negli ultimi tre anni o si sospetti ufficialmente la presenza della CWD (per i cervidi selvatici). Con il successivo Regolamento 206/2010/CE, carni macinate, preparazioni di

carne, prodotti a base di carne e frattaglie, provenienti da cervidi allevati in Canada o negli Stati Uniti, sono esclusi dal consumo umano.

Il primo approccio alla sorveglianza sanitaria nei confronti della CWD avvenne nel 2002 nel Regno Unito: vennero sottoposti ad appositi test diagnostici intestino, milza, linfonodi e tessuto cerebrale ottenuti da 300 animali tra cervi, caprioli, daini e cervi muntjac (*Muntiacus reevesi*). L'esito delle indagini fu negativo. Alla Gran Bretagna seguì la Norvegia con il prelievo e i successivi accertamenti diagnostici condotti su cervello di alci, cervi rossi e caprioli. Anche in questo caso l'esito fu negativo. Il Laboratorio Nazionale di Veterinaria di Svezia, Finlandia e Norvegia chiese un finanziamento nel 2003 per effettuare una serie di test diagnostici nei confronti della CWD, ma il progetto non ebbe seguito. In Germania, un programma *ad hoc* per lo *screening* nei cervidi selvatici fu avviato nel 2002 e poi concluso nel 2005 senza che venisse accertata la presenza di alcun caso di malattia [182]. In Svizzera, un programma di sorveglianza sui cervidi d'allevamento di età superiore ai 2 anni (per lo più daini) è iniziato nel gennaio 2003, finanziato dall'Ufficio Federale di Veterinaria. Cervello, linfonodi e tonsille dei capi morti e di quelli macellati sono stati raccolti ed esaminati; nessun caso di malattia è stato accertato.

In seguito alle pressioni della Comunità scientifica e alle notizie allarmanti che provenivano dagli Stati Uniti circa la CWD, nel Marzo 2003 l'SSC (*Scientific Steering Committee* [186]) ha espresso un parere sulla CWD e sui tessuti che avrebbero potuto comportare un rischio qualora fossero entrati nella catena alimentare umana e animale. Nel *Report* non si è esclusa la possibilità che l'infezione si potesse trasmettere a uomo e animali e che gli organi provenienti da animali infetti potessero essere considerati



Wapiti



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

materiale specifico a rischio. Tuttavia, essendo incompleta l'analisi del rischio e mancando evidenze scientifiche circa la presenza della CWD in Europa, venne proposto di effettuare una sorveglianza sulla malattia per definirne l'incidenza e la prevalenza e contenere al massimo l'eventuale rischio di esposizione da parte dell'uomo e degli animali. A ciò ha fatto seguito il Regolamento 1471/2004/CE (che modifica l'allegato XI del Regolamento 999/2001/CE del Parlamento e del Consiglio Europeo per quanto concerne l'importazione di carni e prodotti ottenuti da cervidi provenienti da Canada e USA), ribadendo il divieto all'introduzione di cervidi vivi, nonché di loro embrioni e sperma, provenienti dai suddetti Paesi.

Nel 2004, l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ha espresso un parere scientifico sull'attuazione di un futuro programma di sorveglianza della CWD in Europa [50], in cui veniva indicato un numero di esemplari di cervi rossi presenti in natura e allevati, rispettivamente pari a 1.000.000 e 196.000 [64]. La sorveglianza nei confronti dell'infezione e della malattia, tuttavia, era ostacolata dalla scarsità di dati inerenti le popolazioni di cervidi (selvatici e non) e delle loro sottospecie in Europa, nonché dalla mancanza di informazioni riguardo la loro distribuzione e densità e dalla carenza di studi scientifici sulla genetica delle popolazioni, sulla diffusione della CWD, sulla suscettibilità/resistenza genetica degli animali e sull'attendibilità dei test diagnostici utilizzati nei cervidi americani. Una volta calcolato approssimativamente il numero degli animali europei (cervo rosso, daino e capriolo), si è passati alla validazione dei test rapidi scegliendo quelli maggiormente sensibili nei confronti di tessuti quali *obex* e linfonodi retrofaringei. Ai fini della sorveglianza, l'EFSA suggerì quindi di scegliere animali d'allevamento o selvatici di età pari o superiore ai 18 mesi, utilizzando un approccio statisticamente corretto: venne pertanto proposto un limite soglia di prevalenza  $\geq$  allo 0,5% per le popolazioni a rischio e  $\geq$  all'1% per le altre. Tra le specie di cervidi da sottoporre a eventuale campionamento vennero incluse le seguenti:

- cervo rosso (*Cervus elaphus elaphus*), a causa delle strette relazioni genetiche con il *wapiti*;
- cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*), con particolare riferimento alle popolazioni presenti in Finlandia e in Svezia;
- animali che potevano essere stati esposti all'agente della BSE e/o della Scrapie in Regioni o Paesi (ad esempio il Regno Unito) in cui la BSE e/o la Scrapie erano diffusamente presenti e in cui i cervidi d'allevamento erano stati alimentati con mangimi composti;
- cervidi in libertà o allevati con presenza di sintomi neurologici o malati.

Venne, inoltre, valutata la possibilità di considerare alcuni organi e/o tessuti come materiale specifico a rischio al fine di evitare l'eventuale trasmissione della CWD all'uomo in seguito al consumo di carni provenienti da animali infetti;

ciononostante, in assenza di dati scientifici, vennero incoraggiati ulteriori studi in materia.

Il Regolamento 36/2005/CE, che modifica il Regolamento 999/2001/CE, afferma altresì che «*Gli Stati Membri possono condurre a titolo volontario la sorveglianza per il rilevamento delle TSE in specie animali diverse dai bovini, ovini e caprini*». D'altra parte, la «*TSE roadmap*» della Commissione Europea del 15 luglio 2005 evidenziava la limitatezza dei dati inerenti la sorveglianza nei cervidi e prevedeva per i primi mesi del 2006 un'indagine che doveva tuttavia partire da un'analisi del rischio non ancora disponibile.

Un *draft paper* diffuso dalla Commissione Europea nei primi mesi del 2006 ha preannunciato l'attuazione di un piano di sorveglianza con lo scopo di rivelare l'eventuale presenza di CWD negli Stati Membri; a questo è seguita l'emanazione della Decisione Comunitaria 2007/182/CE del 19 marzo 2007, che rendeva effettivamente obbligatoria la sorveglianza della malattia in tutti gli Stati Membri dell'Unione in base alle indicazioni del *Report* dell'EFSA del 2004. Gli Stati Membri erano tenuti a concludere le proprie indagini, entro e non oltre la fine della stagione venatoria 2007, su specie bersaglio quali *Cervus elaphus elaphus* e *Odocoileus virginianus* (Finlandia), ma anche su altre potenzialmente sensibili. In seguito, con la Decisione della Commissione 2008/661/CE, il suddetto periodo è stato prorogato fino alla stagione venatoria 2008/2009. Dopo il periodo di sorveglianza, esteso fino al 2010, il Gruppo di Esperti Scientifici sui Pericoli Biologici (BIOHAZ) dell'EFSA ha espresso un parere sui risultati del monitoraggio nei confronti della CWD in Europa [52]. Sono stati valutati, in proposito, 13.000 campioni (raccolti da 21 Stati Membri e dalla Norvegia) di tronco cerebrale e/o di linfonodi retrofaringei ottenuti da esemplari di cervo rosso, cervo dalla coda bianca, daino, alce, renna, renna delle foreste della Finlandia (*Rangifer tarandus fennicus*), capriolo e sika (cervo giapponese, *Cervus nippon*); di questi, 3.242 provenivano da cervi allevati e macellati, morti o con sintomi rilevabili, mentre 9.379 da cervi in libertà trovati morti, cacciati o sintomatici. Nessuno degli animali saggiati è risultato positivo ai test diagnostici; tuttavia, il numero limitato di test effettuati sui cervidi, unitamente alla scarsa rappresentatività dei campioni, alla non definita sensibilità/specificità dei test rapidi e alla mancanza di dati sulla frequenza dei polimorfismi del gene *Prnp*, hanno costituito un forte ostacolo al riguardo. I limiti del campionamento effettuato nella UE hanno interessato in particolar modo le aree geografiche remote e che non ne sono state oggetto, oltre al numero dei campioni molto spesso non rappresentativo raccolti in alcuni Paesi Membri (Austria, Germania, Lettonia, Polonia, Spagna, Repubblica Ceca) e alla mancanza di informazioni su distribuzione geografica ed età degli animali. Ciononostante, l'EFSA ha concluso che l'assenza di riscontri positivi nei cervidi selvatici e di allevamento non



supporterebbe l'ipotesi di un'epidemia di CWD, sebbene la stima quantitativa della reale prevalenza dell'infezione e della malattia avesse degli oggettivi limiti che rendevano necessaria un'interpretazione dei risultati ottenuti con la dovuta cautela. Il Gruppo di Esperti Scientifici ha quindi sottolineato l'esigenza di ulteriori studi volti a caratterizzare la suscettibilità/resistenza genetica nei confronti della CWD nell'ambito delle varie specie di cervidi presenti nei Paesi dell'UE, mettendo questi dati a confronto con quelli ottenuti nei cervidi presenti nel continente Nord Americano. Il Gruppo di Esperti ha altresì consigliato di proseguire l'attività di sorveglianza nei confronti della CWD nei cervidi residenti negli Stati Membri dell'UE, tenendo nel debito conto anche le categorie di rischio, la sensibilità/specificità dei test diagnostici, l'età degli animali e i tessuti bersaglio.

Nel 2011 l'EFSA ha di nuovo espresso un parere scientifico circa la possibile associazione epidemiologica e/o molecolare fra TSE animali e umane, confermando che la presenza di CWD non era stata fino a quel momento rilevata in Europa; tuttavia, sebbene l'agente causale non fosse in grado di indurre la comparsa di malattia in topi transgenici esprimenti PrP<sup>C</sup> umana, la trasmissione sperimentale dell'infezione ad alcune specie di primati non umani era stata comunque dimostrata.

Da sottolineare infine che, dopo il 2010, non è stata condotta in Europa (tranne che in Norvegia nel 2011) alcuna attività di sorveglianza né su cervidi, né su altri ruminanti selvatici; tuttavia, ogni Stato Membro può intraprendere su base volontaria uno o più programmi di sorveglianza.

**Tabella 3. Sorveglianza delle TSE nei cervidi in Italia (campionamento 2006/2007).**

<b>DISTRIBUZIONE DEL CAMPIONAMENTO IN ITALIA (DGVA. VIII/29723/P-I.8.d/48 del 28 agosto 2006)</b>	
<b>Regione</b>	<b>N. Campioni</b>
Prov. Autonoma Bolzano	210
Prov. Autonoma Trento	99
Veneto	99
Lombardia	77
Piemonte	33
Toscana	27
Friuli Venezia Giulia	27
Valle d'Aosta	18
Emilia Romagna	10

### Sorveglianza in Italia

In base a una valutazione effettuata dalla Commissione Europea nel 2003, la popolazione italiana di cervi rossi era stimata intorno alle 44.000 unità, mentre quelle di daini e di caprioli intorno rispettivamente a 22.000 e 400.000 unità.

Il Ministero della Salute, con nota DGVA. VIII/29723/P-I. 8. d/48 del 28 agosto 2006, anticipando l'emanazione della Decisione Comunitaria 2007/182/CE, ha reso obbligatoria la sorveglianza delle TSE sui cervidi dal 2006 al 2007. In quell'occasione fu prevista l'esecuzione di un numero di test (600) sulla base di una pregressa analisi statistica che permetteva di rilevare la presenza di CWD, ovvero di altre TSE, con una prevalenza  $\geq$  allo 0.5% e con livello di confidenza del 95%, esclusivamente negli esemplari di *Cervus elaphus elaphus* presenti in natura. Si escludevano pertanto gli individui allevati regolarmente macellati, la cui popolazione in Italia non è particolarmente numerosa, nonché il cervo dalla coda bianca, che non è presente in Italia. I test diagnostici dovevano essere effettuati su cervi cacciati, rinvenuti morti e su quelli che presentavano sintomatologia clinica, di età superiore ai 18 mesi, preferibilmente di sesso maschile. Le Regioni dovevano farsi carico di sovrintendere e coordinare le relative attività di campionamento (tabella 3). Quest'ultimo, comprendente l'*obex*, i linfonodi retrofaringei mediali e sottomandibolari, veniva eseguito dai Veterinari Ufficiali delle AUSL territorialmente competenti. Le carcasse degli animali sottoposti a prelievo erano mantenute sotto vincolo sanitario fino all'esito dei test rapidi. Questi utilizzavano, a seconda dei casi, una metodica in WB, in ELISA *sandwich* o in chemiluminescenza ai fini della ricerca della PrP<sup>Sc</sup>. In realtà i campionamenti effettuati sono stati 783 (444 nel 2006 e 339 nel 2007), realizzati su 593 cervi sani cacciati, nonché su 87 rinvenuti morti e su 103 di origine sconosciuta (dati estrapolati dal *Report* dell'EFSA, 2010). Il CEA era responsabile dell'esecuzione delle prove di conferma in caso di esito positivo [134]. Tutti i test hanno fornito esito negativo; tuttavia, specie molto numerose quali stambecco (*Capra ibex*), camoscio (*Rupicapra rupicapra*) e capriolo non sono state prese in considerazione.

A oggi, nessuna attività di sorveglianza sanitaria nei confronti della CWD viene regolarmente effettuata in Italia, né su cervidi allevati e cacciati, né su altri ruminanti selvatici.

#### • Analisi del rischio e ricadute ispettive

Il potenziale zoonosico delle TSE è un argomento intrigante con implicazioni di ampia portata. Gli esseri umani sono stati in contatto con gli agenti responsabili delle TSE dei piccoli ruminanti per secoli, ma la problematica è stata presa in seria considerazione solo dopo la comparsa della BSE, l'unica TSE animale per il cui agente causale risulta comprovata la trasmissione all'uomo (vCJD). A tal proposito, la conoscenza dei legami tra BSE e vCJD è di asso-



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

luta rilevanza nel definire correttamente il rischio zoonosico per l'uomo. Se da un lato, tuttavia, la prevalenza della BSE continua a diminuire rapidamente nei Paesi dell'UE, è l'emergere di ceppi atipici di BSE e di Scrapie, dall'altro lato, che richiede particolare attenzione nei confronti di un potenziale rischio per la salute pubblica. Altrettanto importante è il riconoscimento delle lacune nelle conoscenze attuali, che dovrebbe rappresentare uno stimolo per la ricerca affinché si possa dare una risposta scientificamente valida alla domanda sui possibili collegamenti fra TSE animali e rischio zoonosico. È indispensabile, al riguardo, disporre di dati robusti sulla c.d. "barriera di trasmissione" e sull'epidemiologia delle TSE animali e umane, nonché sui ceppi prionici responsabili, sui determinanti di suscettibilità/resistenza genetica dell'ospite e sulla sorveglianza sanitaria nei confronti delle stesse.

Per quanto specificamente attiene alla CWD, l'SSC (Scientific Steering Committee) ha concluso che un rischio, seppur teorico, di trasmissione dell'infezione ai consumatori di prodotti di origine animale contenenti l'agente della CWD non può essere escluso [186]. È stato inoltre affermato che il coinvolgimento precoce e la presenza di PrP<sup>Sc</sup> nei tessuti di animali infetti non consentirebbe di definire un'età limite per gli animali colpiti, superata la quale sarebbe necessario eliminare il materiale specifico a rischio (MSR), come è invece accaduto per bovini, ovini e caprini in relazione alla BSE e alla Scrapie. In epoca successiva, un parere dell'EFSA [50] ha evidenziato che, anche se il rischio derivante dal consumo di selvaggina di cervidi europei poteva essere considerato minore, se non del tutto inesistente, non era tuttavia possibile pervenire ad alcuna valutazione definitiva a causa della paucità di dati scientifici. Il documento in oggetto ha pertanto riconosciuto un rischio potenziale per i consumatori nel caso in cui la CWD fosse stata presente nei cervidi europei e ha concluso che sarebbe stato prudente gestirlo escludendo dalla catena alimentare tessuti quali SNC e linfonodi.

L'eventuale potenziale zoonosico può essere corroborato da adeguati studi epidemiologici e da ulteriori indagini laboratoristiche. Al riguardo, OMS/OIE/FAO sottolineano che, ai fini dello studio delle zoonosi, dovrebbero essere sempre considerati i seguenti principi generali [227]:

- Identificare la/e fonte/i di infezione.
- Stabilire le modalità di trasmissione.
- Identificare le specie ospiti e i *reservoir* degli agenti patogeni.
- Svolgere indagini preliminari sulle specie bersaglio, unitamente a studi ecologici ed epidemiologici sulle specie serbatoio identificate in natura e/o sperimentalmente infettate.

Nel caso in cui l'infezione comportasse un potenziale rischio per la salute umana e animale, si dovrebbero intraprendere programmi di sorveglianza efficaci volti a limitarlo. L'efficacia di questi ultimi deriverebbe dalla rappresentatività della popolazione sotto osservazione, dal ri-

levamento di *cluster* inusuali di morbilità e mortalità (nel tempo e nello spazio), nonché dalla conoscenza relativa alle specie bersaglio, al territorio e alla malattia.

La conoscenza della distribuzione spaziale e temporale delle TSE animali si basa principalmente sulla raccolta dei dati di *routine* ottenuti attraverso le attività di sorveglianza. Le caratteristiche peculiari delle TSE (presentazione clinica eterogenea, lungo periodo di incubazione, incidenza/prevalenza generalmente ridotte, mancata disponibilità di test effettuabili *ante mortem* a causa dell'assenza di risposte infiammatorie o immunitarie, nonché accumulo di PrP<sup>Sc</sup> rilevabile quasi esclusivamente nel SNC) hanno costantemente reso difficile la reale attuazione di un efficace sistema di monitoraggio e sorveglianza. Nel corso degli anni, la sorveglianza attiva ha inoltre reso manifesto lo scarso rendimento di quella passiva in termini di identificazione di casi di TSE, soprattutto nei bovini, sollevando preoccupazioni maggiori rispetto a quelle avute in passato. In particolare, la sorveglianza attiva ha permesso l'identificazione della BSE in molti Paesi europei considerati indenni (come nel caso dell'Italia), confermando in tal modo i risultati della valutazione del rischio geografico precedentemente effettuata dalla UE [185]. Nonostante i requisiti previsti dalla normativa Comunitaria in termini di dimensione del campione secondo le diverse categorie di rischio (animali che potrebbero essere stati esposti alla BSE/Scrapie in Paesi in cui tali malattie erano presenti ad alti livelli; cervi di allevamento cui sono stati forniti mangimi composti; animali allevati/selvatici con sintomi neurologici, malati o in cattive condizioni), l'applicazione selettiva dei test basata sulle dimensioni del campione complessivo, in Paesi ove le TSE sono state notificate con maggior frequenza, potrebbe risultare falsata. In particolare, per quel che concerne la CWD, la sorveglianza attuata in Europa e le misure intraprese per la gestione dell'eventuale rischio zoonosico, mostrano diversi elementi di criticità che dovrebbero essere rielaborati al fine di ottenere una visione generale più corretta.

### • Mancata rappresentatività dei campioni raccolti

Spesso non è stato possibile stimare la distribuzione, le dimensioni e la densità delle popolazioni di animali selvatici e i dati relativi al numero dei cervidi in libertà, tant'è che a volte si faceva riferimento a valori estrapolati da calcoli realizzati nei primi anni del 2000. Alcuni Paesi hanno effettuato dei censimenti e hanno raccolto i dati, che spesso erano limitati a particolari regioni in determinati periodi di tempo: l'Austria ad esempio, con un elevatissimo numero di cervidi cacciati (circa 49.615 secondo le statistiche di caccia, al pari della Germania e della Francia), ha raccolto per il monitoraggio solo 3 campioni. Un'altra questione importante è rappresentata dalla casualità del campionamento in ciascuno Stato membro: per ovvie questioni logistiche, si può infatti presumere che molte zone di campionamento degli animali selvatici non siano andate



a coprire completamente unità geografiche biologicamente rilevanti. Inoltre, la raccolta delle carcasse e degli animali rinvenuti morti è spesso limitata dalla ricerca e dal trasporto degli stessi ai fini delle relative indagini laboratoristiche. A questo bisogna aggiungere che di sovente gli animali morti possono essere ritrovati in uno stato di autolisi post-mortale talmente avanzata che è impossibile effettuare qualsivoglia campionamento. Tuttavia, al di là di questi aspetti, le indagini nei confronti della CWD non forniscono informazioni sulla localizzazione geografica dei cervidi testati. Per quanto riguarda invece gli animali mantenuti in cattività, mancano dati inerenti la posizione e la distribuzione degli allevamenti, la quantità delle aziende e il numero degli animali testati. La dimensione del campione originale, definito dalla Decisione 2007/182/CE, prevedeva un numero di test uguale o superiore a 598, sia per i cervidi selvatici che allevati, da effettuare ogni anno sulle specie bersaglio di età superiore ai 18 mesi. Finlandia, Ungheria, Italia, Lettonia, Polonia, Olanda, Slovacchia, Spagna e Lussemburgo non hanno effettuato campionamenti sugli animali allevati; Austria, Repubblica Ceca e Germania non hanno invece raggiunto la dimensione del campione per i cervidi allevati, così come Austria, Lettonia, Polonia e Spagna non l'hanno raggiunta per i selvatici. Oltre alle specie bersaglio, è stato richiesto a tutti gli Stati Membri di raccogliere il maggior numero possibile di campioni da cervidi di tutte le specie, comprese le "non bersaglio", da ricercare tra quelli malati, morti, feriti o uccisi: dei 13.000 campioni effettuati, circa 1.500 provenivano da altri ruminanti selvatici. Alla luce di questi presupposti, appare evidente che la qualità, la comparabilità e l'ampiezza dei dati accessibili hanno reso difficile delineare un quadro preciso sulla demografia dei cervidi selvatici e allevati nell'Unione Europea, nonché sull'effettiva rappresentatività dei campioni provenienti da questi animali.

• *Suscettibilità dei cervidi europei all'infezione*

La maggior parte delle conoscenze attualmente disponibili sulla CWD si basa su studi e dati raccolti in Nord America [12, 231]. In Europa vengono considerati suscettibili alla CWD il cervo rosso (o cervo nobile), il cervo dalla coda bianca (presente in Finlandia e introdotto dal Nord America) e l'alce (*Alces alces alces*, una sottospecie di *Alces alces*). I dati ottenuti in Nord America sulle varie specie e sottospecie di cervidi non possono essere direttamente applicabili all'interno delle popolazioni dell'UE. Tuttavia, l'agente della CWD è stato di recente trasmesso per via orale al cervo europeo, che ha mostrato di essere potenzialmente suscettibile all'infezione [13]. In uno studio effettuato nel Regno Unito, inoltre, sono stati analizzati cervelli provenienti da cervi europei inoculati per via intracerebrale e orale con omogenati encefalici di bovini affetti da BSE (è probabile che, durante l'epidemia di BSE, molti cervi allevati siano stati alimentati con farine di carne e ossa ottenute da bovini infetti). Tramite IHC e WB,

è stata ritrovata PrP<sup>Sc</sup> nel SNC e periferico, con caratteristiche patogenetiche simili a quelle della BSE (mancato coinvolgimento linfatico), ma con aspetti clinici simili alla CWD [40, 127, 128]. In uno studio condotto nel 2009 per valutare la variabilità del gene *Prnp* in ruminanti selvatici in Europa (cervo rosso, capriolo e camoscio), sono stati analizzati 715 campioni, rivelando un totale di dieci polimorfismi (SNP). Nel cervo rosso, SNP sono stati trovati a livello dei codoni 15, 21, 59, 78, 79, 98, 136, 168 e 226. Questi polimorfismi danno luogo a 12 aplotipi, uno dei quali è identico a quello descritto nel cervo delle Montagne Rocciose. Una mutazione silente al codone 119 è stata altresì rilevata nel camoscio, mentre nessun polimorfismo è stato evidenziato nei caprioli [155]. Ciò appare sorprendente, in quanto capriolo e cervo appartengono alla stessa linea filogenetica (*Prnp* di *Cervus elaphus* possiede svariati siti polimorfici) e camoscio, capra e pecora alla stessa sottofamiglia "*Caprinae*" (*Prnp* di pecora e capra possiede regioni altamente polimorfiche). A questo bisogna aggiungere che la Scrapie è trasmissibile ai mufloni (*Ovis musimon*; [237]) e al *wapiti* [75], poiché la PrP<sup>Sc</sup> ovina, da esperimenti *in vitro*, sarebbe in grado di superare la barriera di specie rappresentata dal genotipo 132LL [69]. Alla luce di queste informazioni, appare evidente come i ruminanti selvatici europei possano risultare suscettibili nei confronti delle TSE. Ciò ribadisce l'importanza dei programmi di sorveglianza e suggerisce, al contempo, che queste specie possano svolgere un ruolo epidemiologico quali potenziali *reservoir* di agenti prionici.

Il programma di sorveglianza effettuato tra il 2006 e il 2010, invece, ha riportato un numero di test su ruminanti selvatici estranei alle specie bersaglio molto limitato. La suscettibilità genetica dei cervidi nei confronti delle TSE, infine, costituisce la base per scoprire quali siano la reale frequenza, distribuzione e diversità dei polimorfismi del gene *Prnp* nei ruminanti selvatici europei; ulteriori indagini in materia andrebbero certamente incoraggiate.

• *Tessuti sottoposti a test diagnostici*

Nel documento dell'EFSA del 2004, sono stati analizzati e discussi diversi metodi diagnostici nei confronti della CWD. L'approccio nel determinare le caratteristiche principali di un test diagnostico (sensibilità, specificità) si basa sul confronto tra i risultati dei campioni provenienti da animali positivi alla CWD e di quelli negativi. Non avendo mai avuto casi riconducibili alla CWD in Europa, l'analisi ha fatto affidamento sui campioni ottenuti da specie americane sensibili alla malattia. Valore aggiunto, in termini di sensibilità diagnostica, è stato dato alla specificità di questi nel discriminare TSE quali CWD, Scrapie e BSE. Le autorità americane hanno suggerito cautela, in quanto i test utilizzati erano validati solo per BSE e Scrapie. Nonostante questo, sono stati confrontati 5 test (*BioRad*, *Prionics LIA*, *Prionics WB*, *VMRDmodified* e *IDEXX*) con la stessa serie di campioni provenienti da tessuti linfatici e si



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

è giunti alla conclusione che tutti erano sufficientemente adeguati. Inoltre, i risultati preliminari di uno studio sulle TSE nei cervidi in Germania nel 2002-2005 dimostrano che la PrP<sup>C</sup> di caprioli, daini e cervi verrebbe rilevata in omogenati di tessuto cerebrale (non trattati con proteinasi K) da BioRad ELISA, Prionics WB e Test LIA. Secondo la Decisione 2007/182/CE, i campioni di *obex* provenienti dalle specie bersaglio, refrigerati o congelati, dovevano essere sottoposti ai test rapidi definiti dal Regolamento 999/2001/CE e s.m. (Allegato X); tuttavia, alcune differenze di specie inerenti il periodo di incubazione, la neuro e la linfoinvasione, devono essere parimenti sottolineate. Nel cervo mulo, per esempio, mentre la PrP<sup>Sc</sup> è rilevabile nei linfonodi retrofaringei nel giro di sole sei settimane dopo l'esposizione orale, diventa evidenziabile nell'*obex* dopo 16 mesi. A questo bisogna aggiungere che il genotipo *Prnp*, come già anticipato, sembra influenzare la cinetica dell'infezione: nel cervo mulo, eterozigote al codone 225SF, si è infatti evidenziato un ritardo nella diffusione della PrP<sup>Sc</sup> al cervello di 13 mesi rispetto al genotipo 225SS. Allo stesso modo, *Cervus elaphus nelsoni*, avente genotipo eterozigote 132MM, presenta la comparsa di depositi di PrP<sup>Sc</sup> nel SNC molto tempo prima del genotipo 132LL. In uno studio condotto su 226 cervi delle Montagne Rocciose, 155 sono risultati positivi a livello sia del tronco encefalico sia dei linfonodi cranici, mentre 43 sono risultati positivi solo a livello del tessuto linfoide e 28 nel solo tronco encefalico [200]. In un'infezione orale sperimentale di 4 cervi rossi, la distribuzione della PrP<sup>Sc</sup> è stata evidenziata nei tessuti cerebrale e linfoide, nonché in altri tessuti periferici [13]. Questi elementi illustrano che la sensibilità di rilevazione delle TSE, utilizzando solo l'*obex* come tessuto bersaglio per la diagnosi di CWD/TSE, è limitata e dipende probabilmente sia dall'età degli animali sottoposti a test che dall'interazione tra diversi fattori dell'ospite (specie/genotipo) e il ceppo di agente prionico. Ulteriori strategie, quali ad esempio il ricorso alla biopsia delle tonsille palatine, del tessuto linfatico associato alla terza palpebra e di quello associato alla mucosa ano-rettale [207], potrebbero essere impiegate ai fini delle indagini *intra vitam* per la diagnosi di CWD.

In tale contesto appare evidente che le attività di monitoraggio e di sorveglianza sulle popolazioni di cervidi europei dovrebbero essere incrementate; ciò in quanto, nonostante la CWD non sia stata mai segnalata in Europa, non se ne può tuttavia escludere l'eventuale presenza, soprattutto a causa della straordinaria capacità di diffusione del suo agente causale. Da valutare con attenzione sarebbero anche i potenziali vettori in grado di diffondere l'agente prionico nell'ambiente, aumentando così le possibilità di esposizione allo stesso.

### Analisi del rischio e sicurezza alimentare

Il primo documento ufficiale in cui si parla di analisi del rischio (*risk analysis*) e della sua applicazione nel campo

della sicurezza alimentare risale al 1995 (FAO/WHO, 1995) [55].

Successivamente la FAO e l'OMS hanno elaborato due documenti importanti nei quali si entra nel merito delle diverse fasi che compongono l'analisi del rischio (FAO/WHO, 1997; FAO/WHO, 1998 [56, 57]). Il documento che costituisce il punto di riferimento essenziale di tutte le esperienze di valutazione del rischio (*risk assessment*) è comunque quello pubblicato dal Codex Alimentarius nel 1999, dal titolo "*Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment*" (CAC, 1999 [58]), nel quale si cerca di standardizzare e raccogliere in un unico schema le metodologie proposte dai diversi Organismi. In ambito europeo le istituzioni, recependo le sollecitazioni di FAO e WHO, hanno introdotto nella normativa sulla sicurezza alimentare i concetti di "*risk analysis*" e "*risk assessment*" mediante il Regolamento 178/2002/CE, al fine di perseguire un livello elevato di tutela della salute umana. L'analisi del rischio è un processo costituito da tre componenti interconnesse: valutazione, gestione e comunicazione del rischio.

La valutazione del rischio si basa sugli elementi scientifici a disposizione ed è svolta in modo indipendente, trasparente e obiettivo. Essa è composta da quattro fasi:

1. individuazione del pericolo (identificazione dell'agente fisico, chimico o biologico che può avere un effetto nocivo sulla salute);
2. caratterizzazione del pericolo (valutazione dei mezzi di diffusione e fonti di contagio; vie di trasmissione; periodo di incubazione, periodo di contagiosità; metodi di controllo e profilassi; clinica, diagnostica ecc.);
3. valutazione dell'esposizione al pericolo (correlazione tra la concentrazione dell'agente presente nell'alimento e la quantità di alimento ingerito; durata dell'ingestione dell'alimento; numerosità dei soggetti esposti);
4. caratterizzazione del rischio (consiste nel descrivere la natura e la grandezza del rischio, includendo anche le incertezze di analisi, tramite l'elaborazione di una stima quantitativa del rischio a cui sono esposti i consumatori o un campione di questi).

L'art. 7 del Regolamento 178/2002/CE aggiunge un elemento chiave per quel che riguarda la valutazione del rischio alimentare: «*Qualora, in circostanze specifiche a seguito di una valutazione delle informazioni disponibili, venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute, ma permanga una situazione d'incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate le misure provvisorie di gestione del rischio necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio (principio di precauzione)*». La gestione del rischio, infatti, è «*un processo, distinto dalla valutazione del rischio, consistente nell'esaminare alternative d'intervento consultando le parti interessate, tenendo conto della valutazione del ri-*



*schio e di altri fattori pertinenti e, se necessario, compiendo adeguate scelte di prevenzione e di controllo» (Regolamento 178/2002/CE).*

Appare evidente quindi, che in assenza di dati scientifici inerenti la caratterizzazione, la valutazione dell'esposizione al pericolo e la caratterizzazione del rischio, non è possibile effettuare una valutazione esauriente e pertanto vengono intraprese misure di gestione onde evitare che il pericolo possa nuocere alla salute umana.

La CWD è una malattia che colpisce anche i cervidi che vivono allo stato selvatico, difficili da monitorare per quel che concerne le migrazioni e gli spostamenti; il variabile periodo di incubazione della malattia e la sintomatologia clinica aspecifica, inoltre, limitano l'efficacia delle misure di sorveglianza. Le modalità di trasmissione legate al consumo di organi, tessuti e fluidi biologici sede di infettività, quali muscoli, grasso e sangue, sono ancora in fase di studio e pertanto, nelle aree ove la malattia è geograficamente presente (Stati Uniti, Canada), gli sforzi sono prioritariamente rivolti alla limitazione della diffusione ambientale dell'agente prionico, nonché al divieto di utilizzo di farine

di carne e ossa provenienti da cervidi per l'alimentazione dei ruminanti, al corretto smaltimento delle carcasse di animali CWD infetti e del relativo materiale a rischio specifico in sede di macellazione (interramento o incenerimento). Imponenti programmi di educazione e formazione, volti a fornire informazioni utili circa la CWD ai portatori di interesse (cacciatori, allevatori, operatori del settore alimentare, consumatori, tassidermisti), vengono costantemente intrapresi; parallelamente, la ricerca scientifica finalizzata a fornire nuove conoscenze sull'eventuale pericolosità dell'agente infettivo nei confronti della salute, viene incoraggiata.

• *Limitazione della diffusione ambientale dell'agente della CWD*

Negli USA l'attività di gestione del rischio relativo alla CWD è principalmente indirizzata ad arginarne la diffusione, riducendo i tassi di prevalenza dell'infezione all'interno delle aree colpite e valutandone il relativo impatto, incentivando al contempo l'attività di ricerca scientifica e la notifica dei casi di infezione alle Autorità Federali di



Wapiti



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

ogni singolo Stato (*Multi-State guidelines for CWD in free-ranging white-tailed deer, mule deer and elk, 2004*). Inoltre, al fine di limitare la diffusione e di ridurre la prevalenza dell'infezione tra le popolazioni di cervidi a vita libera, l'attività venatoria sembra essere uno strumento valido (nello Stato di New York sono stati infatti abbattuti molti cervidi e a partire dal 2005 e la malattia è stata praticamente eradicata); i cacciatori devono seguire apposite linee-guida per la manipolazione delle carcasse animali e la loro conseguente movimentazione all'interno di aree endemiche, oltre a mantenersi costantemente informati circa l'evoluzione dei dati scientifici sulla malattia. In particolare, è vietato spostare carcasse di cervidi o loro parti da un'area considerata endemica per CWD, eccezion fatta per la carne disossata, la pelle pulita (previa asportazione della testa e del midollo spinale), le preparazioni di carni imbustate e sigillate, nonché il cranio e i palchi puliti (senza tessuto cerebrale e altre parti molli annesse) e canini superiori. I cacciatori dovrebbero altresì evitare di utilizzare urina di cervi morti come esca, oltre a evitare di consumare carni di animali con comportamenti anomali e indossare guanti in lattice per le operazioni di scuoiamento; gli stessi dovrebbero parimenti evitare di manipolare o consumare tessuto cerebrale, midollo spinale, nonché occhi, milza, linfonodi e tonsille di animali abbattuti in operazioni di caccia (in Canada e in alcuni Stati americani, ciò si applica anche al pancreas e alla ghiandola mammaria), non sezionando la colonna vertebrale e lavando altresì i coltelli con candeggina e acqua (rapporto 1:1) lasciandoli a bagno per un'ora (*International Association of Fish and Wildlife Agencies, 2006 [91]*). Cervi abbattuti per conto di Agenzie di Ricerca o di Gestione della fauna selvatica, dovrebbero inoltre essere testati sistematicamente nei confronti della CWD, mentre i cacciatori non sono di regola tenuti a sottoporre le carcasse animali ai relativi test diagnostici (sebbene tale obbligo sia vigente in alcuni Stati Nord americani e in Canada), ma possono bensì sottoporre gratuitamente, in alcuni periodi dell'anno, gli animali cacciati ai suddetti test (a meno che non siano in vigore particolari disposizioni federali). L'età minima che i cervidi devono avere affinché i relativi test diagnostici possano essere effettuati sugli stessi varia da Stato a Stato: i test rapidi vengono generalmente effettuati su animali di età compresa tra i 12 e i 18 mesi. Un ulteriore problema riguarda lo smaltimento, sul campo, di materiale biologico considerato potenzialmente infetto, sebbene le Agenzie federali di caccia ritengano assai basso il rischio di diffusione dell'infezione tramite materiale biologico lasciato a terra; ciononostante, questi stessi Enti consigliano lo smaltimento in discarica di cervidi o parti di cervidi potenzialmente infette, raccomandazione che vale soprattutto per i tassidermisti e gli addetti alla lavorazione di carni di selvaggina. In alternativa a quanto sopra, si raccomanda l'interramento della carcassa. Per quanto riguarda invece, i cervidi vivi, è vietato lo spostamento da

aree endemiche per scopi gestionali o di risanamento, a meno che non esistano apposite deroghe o gli animali siano movimentati a fini scientifici. Gli stessi dovranno ovviamente risultare negativi ai test diagnostici nei confronti della CWD. Anche i cervidi allevati, prima dell'autorizzazione allo spostamento, devono risultare negativi e l'allevamento di origine dovrà risultare indenne da CWD nei 60 mesi precedenti la movimentazione. Gli animali, correttamente identificati, devono essere altresì scortati da apposita certificazione veterinaria che ne attesta la negatività nei confronti della malattia e il buono stato di salute. La suddetta documentazione dovrà essere conservata per almeno 5 anni.

### • *Divieto di utilizzo di farine di carne e ossa*

Sebbene non esistano evidenze scientifiche in merito alla possibilità di trasmissione dell'agente della CWD all'uomo, come invece è stato dimostrato per la BSE, la CWD potrebbe tuttavia rappresentare una fonte di potenziale rischio per la salute pubblica (oltre a una fonte di accertato pericolo per la salute animale). Nel 1997, a seguito dell'emergenza BSE in Europa, la FDA promulgò un regolamento (*BSE feed regulation, 1998 [59]*) che vietava l'utilizzo di farine di carne e ossa provenienti da ruminanti per l'alimentazione degli stessi. Dal 2002 tale divieto, riguarda nello specifico, anche gli animali suscettibili alla CWD. Materiali o ingredienti che entrano a far parte di mangimi, derivanti da animali CWD-infetti o ad alto rischio (provenienti da aree endemiche o da allevamenti che hanno manifestato un caso di CWD entro 60 mesi antecedenti), sono considerati inadatti per il consumo e in quanto tali devono essere ritirati. Materiali che provengano altresì da cervidi CWD-negativi o non testati, originanti da aree endemiche o da zone in cui siano in corso programmi di eradicazione della malattia, non potranno essere impiegati per la produzione di mangimi. Materiali che provengono da cervidi selvatici che vivono in zone non endemiche, potranno essere altresì utilizzati per l'alimentazione di animali monogastrici. In nessun caso, comunque, materiale proveniente da cervidi può entrare a far parte dell'alimentazione per i ruminanti. Predisporre siti di alimentazione artificiale (utilizzati in tempi passati) per i cervidi selvatici è vietato.

### • *Smaltimento di carcasse di cervidi CWD-infetti*

In Nord America e in Canada le carcasse e i visceri di cervidi CWD-infetti vengono smaltiti tramite incenerimento ad alta pressione, digestione chimica mediante idrolisi alcalina o interrimento in discariche autorizzate. L'incenerimento prevede l'utilizzo di una sorgente di calore con temperature comprese tra gli 850 °C e i 1.100 °C. Gli inceneritori sono alimentati a legna e riescono a smaltire fino a 100 carcasse al giorno. Tali impianti sono costosi, hanno una capacità limitata e sono altresì in corso studi finalizzati a valutare l'eventuale dispersione aerea



dell'agente infettivo; in ogni caso, risulta pressoché dimostrata la completa inattivazione dell'infettività una volta rispettate le suddette condizioni. L'idrolisi alcalina associata a elevata pressione comporta l'utilizzo di idrossido di sodio o di una soluzione di idrossido di potassio, ad alta temperatura (circa 150 °C), al fine di denaturare le proteine idrolizzandole in peptidi e aminoacidi. La capacità di flusso è bassa, il costo è elevato e vi sono motivi di preoccupazione per quanto riguarda la contaminazione delle acque (in Europa non è consentito smaltire animali affetti da TSE in questo modo). Il metodo più utilizzato (consigliato anche da EPA, USDA e FDA) è l'interramento in discariche autorizzate. Queste strutture devono possedere idonei sistemi di separazione delle carcasse, nonché coperture ingegnerizzate e metodi di gestione del percolato, scientificamente validi. In particolare, dovrebbe essere presente un sistema di riciclaggio del percolato senza una diretta eliminazione verso l'esterno; le carcasse dovrebbero essere altresì collocate su una base di rifiuti solidi alta 20 piedi (corrispondenti a circa 6 metri) e circondate da almeno 12 cm di materiale assorbente; per evitare la formazione di gas può essere forata la cavità addominale e possono essere inoltre aggiunti calce, cemento e materiale con pH alto per riempire i vuoti e minimizzare la produzione di gas. Sopra questi materiali, infine, dovrebbe essere collocato un altro strato di rifiuti solidi e creata una trincea tra i vari siti di interrimento. Non si sa ancora dopo quanto tempo l'agente prionico venga inattivato e quale sia la reale possibilità di inquinamento delle falde acquifere; tuttavia, la messa in discarica di cervidi CWD-infetti, non rappresenterebbe un rischio per la salute umana (*Wisconsin Department of Natural Resources, 2002*). È infine vietato il riciclaggio di carcasse di animali CWD-infetti, in impianti di *rendering*, ai fini della produzione di combustibili o fertilizzanti.

• *Istruzione, formazione e ricerca*

Cacciatori, tassidermisti, operatori del settore alimentare e consumatori vengono costantemente aggiornati circa le misure di precauzione da prendere nei confronti della malattia. Sui principali siti *web* federali, sono messe a disposizione informazioni sull'andamento della stessa, nonché sulla normativa, sui rischi legati al consumo di carne o alla manipolazione di animali o di parti di animali potenzialmente infetti, oltre che sui segni clinici da prendere in considerazione per identificare un animale malato. *Brochures* e opuscoli informativi vengono inoltre distribuiti nelle riserve di caccia e nelle principali aree in cui è condotta l'attività venatoria, nonché nelle aziende che lavorano selvaggina.

Per quanto riguarda invece la ricerca scientifica, numerosi studi sono ancora in corso per determinare la reale capacità zoonosica (o meno) dell'agente di malattia, nonché la suscettibilità/resistenza genetica dei cervidi, il ruolo delle carcasse di animali CWD-infetti nella contaminazione am-

bientale, la suscettibilità di piccoli mammiferi (e il loro potenziale ruolo nella trasmissione della CWD) e la presenza della PrP<sup>Sc</sup> in una serie di tessuti (ghiandola mammaria, pelle, muscoli). Inoltre, la messa a punto di test diagnostici per l'individuazione di nuove metodologie per la diagnosi *intra vitam* rappresentano ulteriori obiettivi su cui stanno lavorando gli studiosi. In Canada, è attualmente allo studio un presidio immunizzante iniettabile per la profilassi nei cervidi allevati.

**Rischio di diffusione in Europa e ricadute ispettive**

La rilevazione crescente della CWD in ampie aree geografiche e la documentata trasmissione per via alimentare dell'agente della BSE all'uomo hanno sollevato preoccupazioni circa il potenziale zoonosico della CWD. Alla fine degli anni '90, tali timori si sono accentuati a causa della segnalazione di CJD in tre pazienti di età inferiore ai 30 anni, cacciatori di cervidi o consumatori di selvaggina cacciata da membri della famiglia. Nessuno dei tre giovani, tuttavia, si era nutrito con carne proveniente da aree endemiche del Colorado e del Wyoming, tant'è che le successive indagini diagnostiche, consentirono di ascrivere la morte a una forma sporadica di CJD [22]. Nel 2001, altri tre pazienti di età compresa tra i 25 e i 28 anni, affetti da una sintomatologia neurologica compatibile con una TSE, sono pervenuti a *exitus*. Tutti mostravano un fenotipo clinico patologico della malattia non ascrivibile a vCJD, non risultando per altro omogenei in corrispondenza del codone 129 del gene *Prnp*, elementi che escludevano entrambi l'esposizione a un medesimo ceppo prionico e, soprattutto, il coinvolgimento causale dell'agente della BSE. Solo due dei tre individui avevano probabilmente consumato carne di un cervo proveniente dal Michigan; a due di loro venne diagnosticata la GSS, mentre il terzo individuo risultò affetto da una forma di sCJD (ECDC, 2002; [23]). Ciononostante, non si può escludere del tutto la possibilità che un caso isolato di malattia umana associato all'agente della CWD si sia verificato o possa verificarsi ancora.

Sulla base di queste considerazioni, l'UE ha posto delle restrizioni al commercio sia di animali vivi (cervidi) provenienti dagli Stati Uniti e dal Canada, sia di carni fresche o lavorate, provenienti da specie sensibili alla CWD e movimentate dai suddetti Paesi. Palchi, trofei di caccia, ovuli, embrioni, sperma e prodotti di origine animale derivanti da cervidi americani e canadesi suscettibili alla CWD dovranno comunque subire diversi trattamenti prima di poter essere importati in Europa.

**Diffusione in Europa**

Nell'ambito degli scambi commerciali, sia di animali vivi che di carni, selvaggina, uova, embrioni o velluto dei palchi, non si hanno informazioni precise: secondo il parere fornito dall'EFSA nel 2004, Germania, Lussemburgo e Spagna importavano trofei di caccia dagli USA e dal Ca-



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

nada, mentre la Francia li avrebbe importati fino al 2002. La Direttiva 2004/68/CE (che stabilisce le norme di polizia sanitaria applicabili all'importazione e al transito nella Comunità di ungulati) prevede che artiodattili selvatici appartenenti ai generi/specie *Alces* ssp., *Axis-Hyelaphus* ssp., *Blastocerus* ssp., *Capreolus* ssp., *Cervus-Rucervus* ssp., *Dama* ssp., *Elaphurus* ssp., *Hippocamelus* ssp., *Hydropotes* ssp., *Mazama* ssp., *Megamuntiacus* ssp., *Muntiacus* ssp., *Odocoileus* ssp., *Ozotoceros* ssp., *Pudu* ssp., *Rangifer* ssp. possano essere importati vivi nell'UE; l'elenco dei Paesi terzi e degli stabilimenti autorizzati dai quali possono provenire figura nel Regolamento 206/2010/UE. In tale Regolamento (che riprende in parte l'allegato IX del Regolamento 999/2001/CE, poi modificato dal Regolamento 722/2007/CE) viene altresì specificato che le carni fresche, escluse le frattaglie e le carni macinate, di animali non domestici o di allevamento dell'ordine degli artiodattili possano essere importate in Europa, accompagnate da un certificato sanitario (RUF per gli artiodattili allevati e RUW per i selvatici) in cui è specificato che gli animali, negativi ai test per la CWD, non derivano da mandrie nelle quali sia stata confermata o si sospetti ufficialmente la malattia (Certificato Veterinario Modello RUF) o da una regione nella quale negli ultimi tre anni sia stata confermata o si sospetti ufficialmente la presenza di CWD (Modello RUW). Tali disposizioni già figuravano nel Regolamento 1471/2004/CE in cui, oltre alle frattaglie e alle carni macinate, anche il midollo spinale era escluso. Secondo il Regolamento 206/2010/UE, il Canada e gli Stati Uniti non sono autorizzati all'esportazione di ruminanti vivi appartenenti alla famiglia *Cervidae* (la Decisione 79/542/CEE già lo vietava), ma solo a quella delle carni fresche. Per quel che concerne i prodotti a base di carne, gli stomaci, gli intestini trattati e le vesciche (salati, riscaldati ed essiccati, secondo la definizione del Regolamento 853/2004/CE) provenienti da artiodattili selvatici e allevati, il Regolamento 999/01/CE ne vieta altresì l'importazione (Allegato IX, Capitolo F); tuttavia, esistono specifiche deroghe per usi particolari, che sono appannaggio dell'Autorità Competente dello Stato Membro in base alla Decisione 2007/777/CE (Kniaz-Hawrot, DG SANCO, comunicazione personale), purché siano conformi ai requisiti sanitari richiesti per le carni fresche o subiscano un idoneo trattamento. Anche i trofei di caccia, menzionati nel Regolamento 142/2011/UE e non trattati, provenienti da uccelli e ungulati costituiti unicamente da ossa, corna, zoccoli, artigli, palchi, denti o pelli, possono essere importati dai Paesi Terzi che rientrano nel Regolamento 206/210/UE. I trofei di caccia che abbiano subito un trattamento sicuro come la tassidermia, la plastinazione o che siano stati altresì montati, possono essere importati da qualsiasi Paese Terzo. Qualora gli stessi provengono da una zona soggetta a restrizioni, devono essere opportunamente bolliti e sanificati. Ossa e prodotti a base di ossa (esclusa le farine di ossa), corna e prodotti a base di corna

(esclusa le farine di corna), zoccoli e prodotti a base di zoccoli (esclusa le farine di zoccoli), da non utilizzare come materie prime per mangimi, fertilizzanti organici o ammendanti, possono essere importati da qualsiasi Paese Terzo. Le corna e i prodotti a base di corna (esclusa le farine di corna), gli zoccoli e i prodotti a base di zoccoli (esclusa le farine di zoccoli) destinati alla produzione di fertilizzanti organici o ammendanti possono essere importati da qualsiasi Paese terzo. Per quel che concerne gli alimenti per animali da compagnia contenenti sottoprodotti di origine animale, secondo il Regolamento 142/2011/UE questi devono provenire da animali sottoposti a verifica ispettiva ed essere dichiarati idonei al consumo umano prima della macellazione (l'elenco dei Paesi Terzi è quello contenuto nel Regolamento 206/2010/UE). Ai sensi del medesimo Regolamento (142/2011/UE), il cibo per animali importato come materiale di categoria 3 (proteine animali trasformate) deve rispettare gli stessi *standard* di quelli prodotti all'interno dell'UE. Più specificamente, il cibo per animali importati deve soddisfare i criteri di igiene stabiliti dalla Normativa comunitaria, essere accompagnato da certificazione sanitaria firmata dal veterinario ufficiale e provenire da impianti di *rendering* autorizzati. La carne di cervo è ricca di ferro ed è comunemente utilizzata per i carnivori domestici con intolleranze alimentari; tuttavia, il quantitativo proveniente dalle aree endemiche per CWD è trascurabile (gli stabilimenti autorizzati per l'esportazione dagli USA e dal Canada sono al di fuori delle aree endemiche). L'UE, in base all'elenco dei Paesi Terzi e degli stabilimenti autorizzati dalla DG SANCO (*Directorate General for Health and Consumer Affaires*), importa selvaggina selvatica riconducibile a biungulati da due laboratori di sezionamento e centri di lavorazione dell'Alberta e del Nunavut, nonché selvaggina allevata e lavorata in macelli del Quebec e dell'Alberta, sebbene nessuno stabilimento sia autorizzato per l'esportazione di stomaci, intestini trattati e vesciche provenienti da ruminanti selvatici. Per gli Stati Uniti, sono altresì riconosciuti otto stabilimenti, cinque per la selvaggina grossa (Texas) e tre per quella allevata; nessun impianto è autorizzato per l'esportazione di stomaci, intestini trattati e vesciche. Per quel che riguarda i trofei di caccia, Stati Uniti e Canada possono esportare questi sottoprodotti come materiali di categoria 3 in base al Regolamento 1069/2009/UE, accompagnati da idonea certificazione sanitaria. Nessuno stabilimento è autorizzato per l'esportazione di ovuli, embrioni o sperma. Prodotti sanguigni non trattati e derivanti da ungulati possono essere infine importati dai Paesi terzi che figurano nel Regolamento 206/2010/CE, purché rispettino i requisiti fissati per le carni fresche. Secondo i dati forniti da EUROSTAT per il 2012, il Canada ha esportato 5 tonnellate di carni e frattaglie provenienti da selvaggina verso la Francia, mentre gli Stati Uniti ne avrebbero esportate 375 tonnellate verso l'Olanda. Ciononostante, in questa categoria, rientrano anche pro-



dotti di origine animale provenienti da specie diverse dai cervidi, ragion per cui una stima precisa non è disponibile. Tre tonnellate di palchi, corna, zoccoli, unghie, artigli e becchi sono stati importati in Europa dagli Stati Uniti equamente suddivisi tra Germania, Ungheria e Danimarca; dal Canada sono state altresì importate 76 tonnellate dalla Germania, 4 dalla Spagna, 2 dalla Danimarca, una tonnellata dalla Francia e una dall'Ungheria. Anche in questo caso, nella categoria figurano materiali provenienti da specie diverse dai cervidi.

Dalle informazioni estrapolate dalla normativa vigente in merito alle importazioni dagli USA e dal Canada di carni, preparazioni di carni, frattaglie e sottoprodotti di origine animale provenienti da cervidi, non sembra esservi un rischio di diffusione della CWD in Europa; ciò a motivo del fatto che i controlli sui requisiti e sul livello sanitario di tali prodotti sono rigorosi e in nessun caso animali CWD-infetti o loro derivati possono entrare nell'UE. Di contro, i dati inerenti gli scambi commerciali negli anni passati sono piuttosto frammentari e potrebbero lasciare intravedere un possibile rischio di ingresso della CWD in Europa, soprattutto alla luce delle recenti scoperte scientifiche riguardanti l'epidemiologia dell'infezione; a tal proposito, le attività di sorveglianza dovrebbero essere incrementate nel prossimo futuro al fine di ottenere una valutazione del rischio più completa ed esaustiva.

### Ricadute ispettive

Sebbene non esistano prove che la CWD possa essere trasmessa all'uomo attraverso il consumo di carni di animali infetti o loro derivati, l'OMS, l'OIE, la FDA e l'EFSA raccomandano di escludere dal consumo umano prodotti ottenuti da animali affetti da qualsiasi TSE. Le principali agenzie di sanità pubblica in Canada e negli Stati Uniti (FDA, APHIS, USDA) sono in linea con questa raccomandazione.

In Canada, tutti i cervidi adulti macellati in base ad accordi commerciali nelle province di Saskatchewan, Manitoba, Alberta e nello Yukon sono testati per CWD e le carcasse vengono ammesse al consumo alimentare solamente in seguito a un risultato negativo ai test diagnostici. Le frattaglie, regolarmente tracciate, possono essere smaltite mediante incenerimento o interrimento profondo in discariche autorizzate prima che i risultati dei test vengano resi noti. Una volta diagnosticata l'infezione, l'animale positivo e i cervidi esposti agli animali CWD-infetti vengono abbattuti e le carcasse smaltite mediante incenerimento o interrimento profondo. Il velluto dei palchi proveniente da animali negativi viene rilasciato dopo ispezione da parte dell'Autorità competente. Per quanto riguarda gli stabilimenti di macellazione, sezionamento e lavorazione, se trattano carcasse provenienti da allevamenti che aderiscono al Piano di certificazione volontario, devono essere riconosciuti dalle Autorità federali, avere delle strutture adeguate, dei piani per la rintracciabilità ed essere facil-

mente sanificabili. I cervidi selvatici cacciati, provenienti da aree in cui è obbligatorio il prelievo della testa per le indagini diagnostiche, potranno essere lavorati (se chiaramente rintracciabili) solo se il risultato al test diagnostico è negativo, altrimenti verranno inceneriti o interrati. Ai cacciatori viene raccomandato di non consumare occhi, cervello, midollo spinale, milza, linfonodi, tonsille, pancreas e carni di cervidi malati o che presentino un comportamento anomalo. Gli organi e i tessuti in cui è stata dimostrata la presenza di infettività dovranno altresì essere lasciati sul posto. Negli USA, sebbene tali raccomandazioni siano ugualmente incoraggiate, non esiste, analogamente a quanto avviene in Canada, alcun divieto esplicito per il consumo di carne o di organi e tessuti potenzialmente infetti. Quando un cervo viene macellato, alcuni animali sono testati nei confronti della CWD in base alle leggi vigenti. La carcassa non può uscire dallo stabilimento fino al momento in cui è reso disponibile l'esito delle prove diagnostiche; le frattaglie possono essere incenerite, interrate o sottoposte a idrolisi alcalina ad alta pressione, in attesa dei risultati delle indagini laboratoristiche. Nel caso in cui l'animale risultasse positivo per CWD, l'intera carcassa subirà lo stesso destino delle frattaglie. Ulteriori misure variano da Stato a Stato. Non sempre sono presenti sul territorio macelli adibiti esclusivamente alla lavorazione degli animali allevati, ragion per cui gli impianti di macellazione sono obbligati a differire nel tempo e nello spazio la manipolazione di carcasse di cervidi selvatici rispetto a quelle di cervidi allevati. I visceri degli animali abbattuti in operazioni di caccia devono essere lasciati sul posto, a meno che nelle immediate vicinanze non siano presenti discariche autorizzate. È interessante notare che nessun organo o tessuto proveniente da cervidi allevati o selvatici è considerato a rischio in sede di macellazione, non venendo pertanto eliminato (indipendentemente dal risultato dei test rapidi) dal consumo umano, come avviene in Europa nei confronti della BSE e della Scrapie. Sia in Canada che negli Stati Uniti non esiste una definizione di materiale specifico a rischio per le carcasse di cervidi non dichiarate infette in seguito all'esito dei test diagnostici (Amaratunga, Brown, Kreeger, Miller, comunicazione personale). In pratica, l'intero corpo dell'animale è considerato a rischio solo nel caso in cui i test per la CWD risultino positivi, a prescindere dall'età dell'animale, dalla zona di provenienza e dall'adesione o meno ai Piani nazionali di certificazione degli allevamenti.

In effetti, solo per la BSE (USDA, FSIS), nel caso che i bovini provengano da zone considerate a rischio, esistono restrizioni al consumo di materiale specifico (MSR), che dovrà essere a sua volta eliminato e smaltito secondo la normativa federale (*Bovine Spongiform Encephalopathy Ongoing Surveillance Plan*, 2006). Analogamente alla CWD, anche per la Scrapie (*National Scrapie Surveillance Plan*, 2010; [142]) non è disponibile un apposito elenco di MSR, cosa che con ogni probabilità è da ricercare nel fatto



## argomenti

Numero 3 - Ottobre 2013

che entrambe le suddette TSE non sembrano rappresentare un pericolo per la salute umana, diversamente da quanto noto a proposito della BSE; inoltre, il volume di cervidi macellati immessi in commercio è molto basso (Amarantunga, Brown, Kreeger, Miller, comunicazione personale). Appare evidente che le misure poste in essere negli USA e in Canada ai fini della sorveglianza nei confronti delle diverse TSE animali offrono diversi spunti di riflessione se confrontate con quelle adottate in Europa. A tal proposito, la scelta di eliminare una serie di organi e tessuti (MSR) di ovi-caprini e bovini nasce dal fatto che, sulla base della valutazione del rischio, questi materiali potrebbero costituire una fonte di pericolo per il consumatore, in quanto gli stessi rappresentano sedi e distretti in cui è stata chiaramente dimostrata la presenza di infettività. Infatti, come già anticipato in merito all'attività di sorveglianza condotta nei Paesi dell'UE sulle TSE dei ruminanti, una serie di organi e tessuti vengono eliminati in base all'età dell'animale, mentre per altri si prescinde da questo parametro in quanto potenziali sedi di precoce localizzazione dell'agente infettivo. A tal proposito, nella CWD sperimentalmente indotta nel cervo mulo, la deposizione di PrP<sup>Sc</sup> nei tessuti linfoidei si è osservata già a partire dal quarantaduesimo e dal novantesimo giorno successivi all'infezione *per os*; alla pregressa colonizzazione di tali distretti ha quindi fatto seguito la neuroinvasione prionica, con conseguente colonizzazione dell'ENS e del SNC [63,235]. Sebbene la trasposizione dei dati ottenuti nei predetti modelli sperimentali di infezione a cervidi naturalmente esposti debba essere fatta con cautela, la possibilità di rinvenire la presenza di PrP<sup>Sc</sup> in vari distretti linfoidei di giovani animali dovrebbe essere tenuta nella massima considerazione. A questo deve aggiungersi il fatto che esiste un certo margine di errore riguardante i test rapidi utilizzati nella diagnosi di CWD, che non risultano ufficialmente validati per i cervidi. Al riguardo, infatti, il limite di rilevabilità della PrP<sup>Sc</sup> da parte dei vari test diagnostici potrebbe rendere inadeguata l'applicazione degli stessi ai giovani cervidi, nei quali l'infezione, qualora presente, potrebbe non essere rilevata, con conseguente esito falsamente negativo al test. Per quanto riguarda invece gli animali abbattuti in attività di caccia, la sorveglianza passiva svolta dalle competenti Autorità statunitensi e canadesi, così come la valutazione di un'eventuale sintomatologia neurologica eseguita dai cacciatori, non sarebbero in grado di classificare adeguatamente gli animali in relazione al loro *status* nei confronti della CWD; come più volte riferito, infatti, le manifestazioni cliniche compaiono solo nella fase terminale dell'infezione e risultano aspecifiche. Di contro, animali apparentemente sani potrebbero risultare portatori di un'infezione in fase preclinica, caratterizzata dalla presenza di depositi di PrP<sup>Sc</sup> a livello di diversi tessuti periferici. Nelle zone in cui non è obbligatoria l'esecuzione dei test rapidi, il consumo di carne di cervidi

CWD-infetti in fase preclinica potrebbe pertanto costituire un fattore di rischio ai fini della diffusione dell'infezione. A tal proposito, il prelievo di frammenti biotici tonsillari e/o della mucosa ano-rettale (RAMALT) rappresenta un valido ausilio nella diagnosi precoce dell'infezione, che molti Enti internazionali di ricerca stanno cercando di affinare. Recentemente, un nuovo metodo per la diagnosi preclinica dell'infezione è stato altresì sperimentato con successo, il *Surround Optical Fibr Immunoassay* (SOFIA). Esso permette di svelare con alta precisione la presenza di PrP<sup>Sc</sup> nei fluidi corporei, utilizzando fibre ottiche in grado di catturare le emissioni di fluorescenza di un campione positivo.

Un'altra sostanziale differenza rispetto alla gestione delle TSE dei ruminanti in Europa risiede nello smaltimento del materiale potenzialmente infetto.

Secondo il Regolamento 1069/2009/CE, infatti, rientrano nella categoria 1 i seguenti sottoprodotti di origine animale:

- corpi interi e tutte le loro parti, incluse le pelli, degli animali sospettati di essere affetti da una TSE o nei quali la presenza di una TSE è stata ufficialmente confermata;
- gli animali abbattuti nel quadro di misure di eradicazione delle TSE;
- i materiali specifici a rischio (allegato V, Reg. Ce 999/2001);
- i corpi interi, o loro parti, di animali morti contenenti materiali specifici a rischio al momento dello smaltimento. Tali prodotti devono essere inceneriti/coinceneriti (con o senza trasformazione preliminare mediante sterilizzazione sotto pressione) o trasformati in combustibile e non possono essere interrati in discariche autorizzate (a meno che non siano MSR provenienti da animali negativi al test diagnostico). In base al Regolamento 142/2011/UE i sottoprodotti derivanti da animali, sospettati di essere affetti da TSE, o nei quali sia stata diagnosticata una TSE o altresì abbattuti nel quadro di misure di eradicazione di una TSE, non devono essere utilizzati per l'alimentazione di animali, né tantomeno come fertilizzanti, cosmetici, dispositivi medici o medicinali.

Inoltre, la documentata capacità della PrP<sup>Sc</sup> di interagire con diverse sostanze presenti nel terreno desta ulteriori motivi di preoccupazione; in proposito, terreni contenenti alcuni comuni minerali presenti nell'argilla, quali ad esempio la montmorillonite (Mte) e la caolinite (KTE), interagirebbero in maniera più efficace con i prioni rispetto ai terreni contenenti quarzo [99]. Ciò può contribuire a spiegare la diffusione di tali agenti, nonostante i ridotti livelli di infettività presenti nell'ambiente [18]. In un esperimento condotto in Winsconsin, è stato dimostrato come l'argilla leghi in maniera piuttosto stabile la PrP<sup>Sc</sup>. Omogenati di argilla e PrP<sup>Sc</sup> sono stati somministrati per via orale a criceti e questi hanno manifestato la malattia con tempi di incubazione inferiori rispetto a quelli inoculati con la sola PrP<sup>Sc</sup>. La pe-



netrazione dei prioni nel suolo, inoltre, sarebbe risultata maggiore anche in presenza di dosi infettanti molto basse dell'agente infettante [100]. Il suolo potrebbe quindi fungere da serbatoio ambientale [178], contribuendo in tal modo alla trasmissione/diffusione dell'agente prionico a pecore, capre e cervidi, soprattutto in considerazione del fatto che questi animali, durante l'attività pascolativa, ingeriscono più o meno rilevanti quantità di terreno e che la ruminazione non sembra spiegare effetti litici nei confronti della PrP<sup>Sc</sup> [180]. Alla luce delle suddette evidenze scientifiche, le carcasse e le parti di animali infetti, una volta abbandonate sul terreno o interrate in discariche autorizzate, così come le acque reflue dei macelli, potrebbero rappresentare importanti fonti di contaminazione ambientale in grado di veicolare l'agente infettivo anche ad altre specie recettive. Cercare di capire i meccanismi attraverso cui i prioni resistono e diffondono attraverso il terreno è pertanto fondamentale per una accurata valutazione del rischio [179]. Studi precedenti hanno dimostrato che l'infettività prionica persisterebbe nel terreno per due o più anni dopo l'interramento di omogenati di tessuto cerebrale infetto [30, 188].

Un altro recente studio, in cui sono stati utilizzati sabbia di quarzo e materiali di ricopertura comunemente presenti nelle discariche, ha documentato un più elevato contenimento della PrP<sup>Sc</sup>, che non sarebbe percolata nel sottosuolo, limitando così il rischio di diffusione dell'agente prionico [94]. I più moderni impianti di smaltimento utilizzati in Canada e negli USA prevedono un riconoscimento da parte dell'EPA e della CEAA (*Canadian Environmental Assessment Agency*); gli stessi devono essere altresì situati in zone dove è minimo il rischio di inquinamento delle falde acquifere e avere un sistema per il riciclaggio dei reflui e per lo smaltimento dei fanghi di lavorazione. La maggior parte delle volte, insieme all'interramento delle carcasse, viene utilizzata anche una copertura in plastica (polietilene), poiché questa sembrerebbe in grado di complessare in maniera piuttosto stabile la PrP<sup>Sc</sup>, evitando che la stessa possa diffondere nel sottosuolo [61]. Uno studio recente, infine, ha valutato le capacità proteolitiche di un composto acquoso estratto dal lichene *Parmelia sulcata*: esso sarebbe in grado di degradare la PrP<sup>Sc</sup> riducendone notevolmente l'infettività e aprendo nuove prospettive sul controllo della diffusione ambientale [101].

### Conclusioni

La drammatica epidemia di BSE ha chiaramente incentrato la ricerca nel campo delle TSE in Europa e nel resto del mondo. In proposito, le evidenze emerse dall'applicazione di una serie di tecniche innovative volte a chiarire alcuni aspetti patogenetici di tali infezioni e la distribuzione dell'infettività nei diversi tessuti dell'ospite, hanno fornito dati scientifici utili alla gestione dell'epidemia e

all'adozione di specifici piani di sorveglianza; ciononostante, rimangono a tutt'oggi da chiarire numerosi aspetti relativi alla biologia, alla natura e alle modalità di replicazione dell'agente infettante, nonché alla patogenesi e alla diagnosi precoce dell'infezione. La sorveglianza attiva nei confronti delle TSE degli ovi-caprini è stata intrapresa a partire dal marzo 2002, con il preciso scopo di acquisire dati epidemiologici relativi alla malattia in tutti i Paesi europei e considerando qualsiasi TSE potenzialmente trasmissibile ad altre specie. Di rilevanza cruciale, in tale ambito, è stato il principio di precauzione, la cui applicazione ha condotto all'obbligo della sorveglianza attiva e passiva pure sulle TSE degli ovi-caprini e alla contestuale esclusione di MSR dalla catena alimentare umana, un fondamentale principio che dovrebbe offrire una serie di validi spunti anche per una rinnovata gestione sanitaria della CWD nei cervidi. A tal proposito, la precoce colonizzazione prionica del SLR dell'ospite, che l'agente della CWD condivide insieme a quello della Scrapie, suggerisce che l'IHC e altre tecniche di indagine possano consentire di identificare con maggiore accuratezza gli animali infetti in fase preclinica, anche in considerazione del fatto che l'*obex* risulta a volte negativo ai test rapidi anche in animali CWD-infetti. Non del tutto privo di significato, inoltre, sarebbe prendere in considerazione la possibilità che organi e tessuti colpiti da flogosi croniche a carattere linfo-proliferativo possano a loro volta albergare depositi di PrP<sup>Sc</sup>, come già per altro dimostrato da precedenti lavori condotti su modelli di infezione sperimentale e naturale [85, 116, 187, 4, 77, 47]. Anche il documentato riscontro della PrP<sup>Sc</sup> in tessuti quali muscolo scheletrico e grasso, normalmente destinati al consumo umano, andrebbe supportata da ulteriori indagini scientifiche.

Le ricerche finora condotte hanno svelato limiti importanti nell'attività di sorveglianza europea per quel che riguarda la CWD (mancata casualità del campionamento, mancata stima della reale prevalenza dell'infezione degli animali a vita libera) e, sebbene non sia stato accertato alcun caso di positività nei cervidi, la stessa attività di sorveglianza dovrebbe proseguire senza indugio al fine di escludere l'eventuale presenza di una TSE nelle diverse popolazioni di ruminanti selvatici. I futuri programmi di monitoraggio e di sorveglianza sanitaria attuati nei confronti delle diverse popolazioni di cervidi presenti in Europa dovrebbero tener conto, infine, degli obiettivi da raggiungere e degli ultimi dati scientifici riguardanti la diffusione dell'infezione, i tessuti bersaglio dell'agente, la sensibilità/specificità dei test diagnostici e le categorie di animali a rischio, unitamente all'età e alla suscettibilità/resistenza genetica dei medesimi [50, 53].

La bibliografia è disponibile presso la redazione: [argomenti@sivemp.it](mailto:argomenti@sivemp.it)