

MALATTIE NEURODEGENERATIVE

La Scrapie ovina



DOMENICO SCIOTA¹, GIOVANNI DI GUARDO²

¹ Medico veterinario libero professionista, Genzano di Lucania, Potenza

² Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Località Piano d'Accio, Teramo

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (TSE) sono un gruppo di malattie neurodegenerative sostenute da agenti eziologici “non convenzionali” che colpiscono l’uomo e gli animali.

La Scrapie della pecora e della capra, è considerata unanimemente il “prototipo” di tali patologie poiché è descritta nelle greggi del Regno Unito sin dal 1732; nel 1750 è stata segnalata in Francia ed è stata indicata come “*tremblante*” (tremore), mentre in Germania come “*traberkrankheit*”, ovvero “malattia del trotto”, denominazioni che fanno riferimento alla sintomatologia clinica neurologica caratterizzata da atassia e incoordinazione dei movimenti. Il nome della malattia, coniato in Scozia nel 1800, prende origine da “*scratchie*”, a sua volta derivante dal verbo inglese “*to scratch*”, per il caratteristico ed eccessivo grattamento delle pecore contagiate; in Italia la

malattia è stata descritta per la prima volta in Piemonte nel 1977 da Cravero *et. al* [339]. Questa era la sola TSE animale conosciuta fino a 40 anni orsono, ma la comparsa della drammatica epidemia di encefalopatia spongiforme bovina (*Bovine Spongiform Encephalopathy*, BSE) nel Regno Unito nella seconda metà degli anni ottanta [477] ha drasticamente modificato lo scenario delle TSE suscitando in maniera esponenziale l’attenzione della Comunità Scientifica.

Ad avvalorare ulteriormente tale affermazione si pongono pure le numerose TSE descritte, sempre nel Regno Unito, in diverse specie animali domestiche (gatto) e selvatiche (felidi e ruminanti selvatici mantenuti in cattività all’interno di giardini zoologici), nonché nell’uomo (variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob, vCJD, in giovani pazienti inglesi), quale conseguenza dell’esposizione (prevalentemente o esclusiva-

Tabella 1. Elenco delle TSE umane e animali [264 modificato].		
TSE	Ospite naturale	Via di trasmissione
Scrapie	Pecora, capra	<ul style="list-style-type: none"> • Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della Scrapie) • Trasmissione orizzontale e, con ogni probabilità, anche verticale • Trasmissione per via "iatrogena" attraverso l'impiego di vaccini allestiti con tessuto cerebrale di ovini Scrapie-infetti
Encefalopatia spongiforme bovina (BSE)	Bovino, capra	<ul style="list-style-type: none"> • Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE) • Trasmissione verticale non accertata • Sperimentalmente trasmissibile sia alla capra sia alla pecora
Chronic wasting disease (CWD)	Cervo dalla coda bianca, alce, cervo dalla coda nera, wapiti, cervo mulo	<ul style="list-style-type: none"> • Acquisita (ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della CWD) • Trasmissione orizzontale
Encefalopatia spongiforme del visone (TME)	Visone	Acquisita (fonte sconosciuta)
Encefalopatia spongiforme felina (FSE)	Gatto, puma, ocelot, ghepardo, tigre, leone, gatto dorato asiatico	<ul style="list-style-type: none"> • Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE. • Trasmissione verticale (ipotizzata, non accertata)
Encefalopatia spongiforme degli ungulati esotici	Kudu, nyala, antilope	Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE
Scrapie "atipica"	Pecora, capra	Sconosciuta
Encefalopatia amiloidotica spongiforme bovina (BASE)	Bovino	Sconosciuta
Encefalopatia spongiforme del dromedario (CPD)	Dromedario	Sconosciuta
Kuru	Uomo	Ingestione di parti di cadaveri in occasione di riti funerari (Papua-Nuova Guinea)
Variante del morbo di Creutzfeld-Jakob (vCJD)	Uomo	<ul style="list-style-type: none"> • Ingestione di matrici alimentari contenenti l'agente della BSE • Trasfusioni di sangue di pazienti vCJD-infetti
Forma sporadica del morbo di Creutzfeld-Jakob (sCJD)	Uomo	<ul style="list-style-type: none"> • Sconosciuta • Mutazione somatica o conversione spontanea della PrP^c in PrP^{Sc}
Forma iatrogena del morbo di Creutzfeld-Jakob (iCJD)	Uomo	Esposizione accidentale, conseguente a procedure e/o trattamenti medico-chirurgici, in cui venga utilizzato materiale CJD-infetto
Forma familiare del morbo di Creutzfeld-Jakob (fCJD)	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
Sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
Insonnia familiare fatale (FFI)	Uomo	Mutazione del gene <i>Prnp</i>
Insonnia fatale sporadica	Uomo	Sconosciuta

mente per via orale, con ogni probabilità) all'agente della BSE. In tal senso, appare più che lecito definire la BSE una nuova zoonosi e l'unica TSE animale, al tempo stesso, per la quale sia stato chiaramente documentato un potenziale zoonosico [119]. Da quando poi, esattamente dieci anni più tardi, si è compreso che una nuova TSE umana, denominata variante del morbo di *Creutzfeld-Jakob* (vCJD) [486], sarebbe intimamente connessa

in termini di causa-effetto a una pregressa esposizione all'agente della BSE [65, 207], oltre al già relevantissimo interesse scientifico, ne è derivata una contestuale situazione di panico nell'opinione pubblica. L'interesse sulle TSE, definite anche "malattie da prioni", sarebbe da imputare al fatto che esse possono colpire l'uomo e diverse specie animali, domestiche e selvatiche (tabella 1).

Le TSE, in condizioni naturali, tendono a manifestarsi prevalentemente nei ruminanti.

L'encefalopatia spongiforme bovina

La BSE – osservata originariamente nel Sud della Gran Bretagna nel novembre 1986, diagnosticata per la prima volta presso il *Central veterinary laboratory di Weybridge* e segnalata successivamente in diversi Paesi europei, tra cui l'Italia – è una malattia neurodegenerativa cronica, ad esito costantemente mortale, che colpisce specialmente le vacche da latte di 3-8 anni, con un picco d'incidenza in quelle di 4-6 anni. Il periodo d'incubazione è di 3-8 anni (in media 4-5 anni) e la maggior parte degli animali contrae l'infezione a un'età inferiore ai 2 anni.

Un po' di storia

Si ritiene che l'esposizione della popolazione bovina inglese all'agente della BSE sia databile tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80, in concomitanza con la produzione, mediante trattamenti tecnologici più blandi (drastica riduzione delle temperature) di quelli usati in precedenza, di farine di carne ed ossa di ruminanti contaminate da un agente Scrapie-simile (trasmissione orizzontale indiretta) presumibilmente derivato dagli ovini, specie in cui la Scrapie è endemica nel Regno Unito. Ad aggravare la situazione c'era, inoltre, la mancata estrusione dei grassi delle suddette farine, complice il significativo calo dei prezzi che queste materie prime avevano registrato nel frattempo sui mercati.

Tuttavia, in un rapporto del Parlamento inglese pubblicato nell'ottobre 2000 (*Report of the BSE Inquiry, UK Parliament*), si è prospettato che la BSE abbia avuto origine, all'inizio degli anni '70 del secolo scorso, a seguito di una mutazione spontanea intervenuta a livello del gene della PrP di un animale di specie bovina o di altra specie, quindi, in definitiva, attraverso modalità sostanzialmente non difformi rispetto a quanto si verificherebbe in corso di CJD sporadica dell'uomo. L'epidemia sarebbe quindi stata rinfocolata, a livelli esponenziali, dal riciclaggio in alimentazione bovina di tessuti provenienti da bovini BSE-infetti, attraverso modalità di contagio intra-specifico (bovini-bovini) di tipo "simil-cannibalistico", allo stesso modo in cui, alla fine degli anni '50, era successo in Papua-Nuova Guinea con l'epidemia di Kuru.

La crescita di questa epidemia, quindi, ha raggiunto livelli devastanti nel Regno Unito; si ritiene, infatti, che in un decennio abbia prodotto circa 1 milione di capi infetti con quasi 190.000 casi di malattia clinicamente manifesta; il picco si è riscontrato nel 1992 con oltre 37.000 nuovi casi, contro i poco più di mille del 2000. 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 i tessuti di origine bovina (*Specified bovine offals, SBOs*) che, per ana-

logia con la Scrapie, venivano ritenuti potenzialmente infetti. Dopo questi provvedimenti, l'epidemia di BSE ha subito negli anni una consistente riduzione. La Comunità Europea, inoltre, a seguito dell'evidenza ottenuta nel 1997 che la vCJD fosse legata all'esposizione umana all'agente della BSE [65, 207], ha posto particolare attenzione sulla possibilità che l'agente della BSE 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).

Le caratteristiche comuni delle TSE

L'evento patogenetico fondamentale in tutte le TSE umane e animali è costituito da una modificazione conformazionale post-traslazionale di una proteina normalmente codificata dall'ospite, la proteina prionica cellulare (PrP^C), nella sua isoforma patologica, la proteina prionica Scrapie-associata (PrP^{Sc}), che si accumula progressivamente a livello soprattutto del sistema nervoso centrale (SNC), e in minor misura a livello di diversi distretti extra-neurali dell'ospite [119].

Tutte le TSE presentano alcune caratteristiche biologiche comuni: lunghi periodi di incubazione (mesi-anni); esordio subdolo e poco specifico; quadro clinico progressivo caratterizzato da una serie di disturbi neurologici e comportamentali, con esito costantemente fatale; presenza di lesioni di tipo regressivo (distrofia neuroassonale, neuropatia degenerativa), pressoché esclusivamente localizzate a livello di SNC e apprezzabili solo istologicamente; assenza di risposta infiammatoria o immunitaria morfologicamente dimostrabile, almeno in senso classico; accumulo, sia a livello di SNC, sia di tessuti periferici, linfatici ed extra-linfatici dell'ospite (seppur non costantemente), di PrP^{Sc}; trasmissibilità a una varietà di specie animali sia in condizioni naturali che sperimentali [264].

A supporto della capacità di questi agenti di superare la cosiddetta "barriera di specie", cui si è già accennato in precedenza, è stata dimostrata da tempo la suscettibilità della specie ovina e caprina all'infezione sperimentale sostenuta dall'agente della BSE [143] e successivamente si è giunti all'identificazione di più casi di infezione naturale in capre sempre ad opera dell'agente della BSE [129,438].

La trasmissione inter-specifica degli agenti responsabili delle TSE sia in condizioni naturali sia sperimentali, comunque, può avere esiti diversi che possono variare in modo assolutamente imprevedibile. Si può avere, infatti, una completa assenza di malattia, una forma subclinica o con un decorso piuttosto lungo, oppure una trasmissione totalmente efficace con segni di malattia conclamati.

Quando un ospite risulta totalmente resistente all'infezione da prioni provenienti da un'altra specie si parla di "barriera di specie assoluta". Ad esempio, il coniglio sembra essere resistente alla trasmissione intracerebrale di prioni provenienti

da molte specie, come nel caso di ceppi murini di Scrapie, CJD umana, kuru e BSE [472].

Le forme classiche e quelle atipiche

Accanto alle forme classiche di TSE che colpiscono i ruminanti, con particolare riferimento al bovino (BSE) e agli ovini e caprini (Scrapie), recenti studi hanno dimostrato l'esistenza di forme cosiddette "atipiche" di malattia provocate da ceppi prionici aventi profili immunobiochimici e immunostochimici della PrP^{Sc}, nonché profilo neuro-istolesivo diversi da quelli responsabili delle forme classiche. Queste forme sono sostenute dai ceppi Nor98 e Nor98-like, identificati per la prima volta nel 1998 in una pecora norvegese [40], annoverando al loro interno anche casi di BSE atipica descritti nei primi anni del terzo millennio e denominate BASE (*Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy*) [44, 77], sostenuti a loro volta da ceppi "BSE-H" (*high-type*) e "BSE-L" (*low-type*) in base al pattern di glicosilazione ed al peso molecolare della PrP^{Sc} [73]. Oltre ad essere ben distinte sotto il profilo epidemiologico, Scrapie "classica" e "atipica" costituiscono due entità nosologiche differenti dal punto di vista clinico-patologico e immunobiochimico, potendo anche coesistere [315]. L'origine della Scrapie "atipica" rimane a tutt'oggi sconosciuta, sebbene sia diffusamente ritenuta una forma naturale, sporadica e non contagiosa di Scrapie [119].

Le TSE, tuttavia, non si limitano a colpire le sole specie ovina, caprina e bovina, ma possono ritrovarsi anche in altri ungulati, alcuni ungicolati nonché alcuni primati non umani.

Non possiamo dimenticare, infatti, la *Chronic Wasting Disease* (CWD) o malattia del dimagrimento cronico dei Cervidi segnalata per la prima volta in Colorado (USA) nel 1967 [487, 488]; la malattia, inizialmente correlata alla cattività e associata a carenze nutrizionali e allo stress, è stata riconosciuta come una nuova TSE nel 1978 [487, 488]. 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 [50, 246, 329, 439]. 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 [178, 328, 439], 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 [65, 207] 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 [21, 385], oltre a sistema linforeticolare (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 sembra presentare a oggi un potenziale rischio zoonosico molto basso [30, 249, 402, 445], 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 [264].

Dobbiamo inoltre ricordare l'encefalopatia spongiforme felina (*Feline Spongiform Encephalopathy, FSE*), l'encefalopatia spongiforme del visone (*Transmissible Mink Encephalopathy, TME*) e le encefalopatie spongiformi degli ungulati selvatici nei giardini zoologici [395].

Meritevole di segnalazione è anche la recente descrizione di una nuova malattia prionica (*Camel Prion Disease, CPD*) nei camelidi e, più precisamente, nel dromedario (*Camelus dromedarius*) all'interno di una popolazione sahariana dell'Ouargla, nel sud-est dell'Algeria [25].

Infine, per quanto concerne i primati non umani (*Non-Human Primates, NHP*), sono stati diagnosticati alcuni casi in uno zoo francese tra il 1996 e il 1999 [239].

Nella specie umana le malattie da prioni sono conosciute da molto tempo. Nella tribù di lingua Fore della Papua Nuova Guinea l'antropofagia rituale o, per meglio dire, l'usanza cannibalistica di mangiare durante alcuni riti funerari, il cervello dei cadaveri, ha determinato la comparsa di una TSE denominata *Kuru*, la quale è stata la prima causa di mortalità in queste popolazioni durante la prima metà del XX secolo. Attualmente le TSE umane sono suddivisibili in tre gruppi: sporadiche; (CJD sporadica, *Insomnia sporadica fatale*); genetiche, (CJD Familiare, sindrome di *Gerstmann-Sträussler-Scheinker/GSS*, *Insomnia Familiare Fatale/FFI*) che si comportano come vere e proprie malattie ereditarie pur essendo trasmissibili sperimentalmente al pari di tutte le altre TSE [371]; iatrogene (CJD *iatrogena*), responsabile di una grave epidemia che ha causato la morte di 250 pazienti e trasmessa a seguito della somministrazione di estratti ipofisari contaminati, nonché a seguito dell'effettuazione di interventi chirurgici mediante strumenti e/o attrezzature contaminate [119, 371].

Infine, come precedentemente esposto, il passaggio dell'agente della BSE all'uomo ha causato la comparsa della vCJD, responsabile di oltre 200 decessi (la maggior parte dei quali nel Regno Unito) e di una delle più grandi crisi economiche, sanitarie e alimentari della storia [8]. La presunta trasmissione dell'infezione attraverso le trasfusioni di sangue ha indotto l'Unione Europea ad adottare una serie di ulteriori misure restrittive finalizzate al contenimento del rischio di esposizione umana all'agente della BSE e alla tutela della salute pubblica.

L'agente patogeno

Una delle questioni ancora oggi oggetto di dibattito sulle TSE riguarda la natura eziologica dell'agente patogeno. Queste patologie, infatti, vengono definite infettive, trasmissibili e sostenute da agenti eziologici di natura biologica dotati di caratteristiche "non convenzionali". Nel corso degli anni le teorie eziologiche sono state diverse e numerose, alcune delle quali hanno attualmente un valore puramente storico, essendo state enunciate da autorevoli scienziati e considerate potenzialmente valide fino al 1982, quando *Stanley Prusiner* annunciò la rivoluzionaria "Teoria prionica", oggi ampiamente accettata dalla comunità scientifica [377]. Tuttavia, alcune fra le suddette teorie sono ancora oggi oggetto di studio [303, 304]. Le teorie che hanno preceduto quella di Prusiner sono caratterizzate da un aspetto comune. In generale la maggior parte di esse sostiene che le TSE siano causate da agenti simil-virali o, comunque, da agenti dotati di materiale genetico che ne permetta la replicazione a livello cellulare.

Teoria dei virus lenti

La definizione di "virus lento", coniata in Islanda nel lontano 1954 origina da due caratteristiche comuni ad altrettante malattie coesistenti in quel Paese, vale a dire Maedi-Visna e Scrapie. Questa teoria nasceva sulla base di due caratteristiche comuni a entrambe le suddette malattie: il lungo periodo di incubazione; le dimensioni dell'agente infettante, che in seguito a prove di laboratorio vennero stimate intorno ai 40 nm.

Ipotesi del virus filamentoso

Secondo questa ipotesi, la Scrapie sarebbe sostenuta da un virus che morfologicamente coinciderebbe con le fibrille di amiloide Scrapie-associate (*Scrapie-Associated Fibrils*, SAF). Tuttavia, il diametro delle SAF (4-6 nm) è troppo ridotto per contenere acidi nucleici. Inoltre, è stato dimostrato che l'infettività non sarebbe associata alle SAF.

Ipotesi del viroide

Studi di inattivazione mediante l'uso di radiazioni ionizzanti indussero a ritenere che l'agente eziologico fosse compatibile con una molecola di RNA di 200-400 nucleotidi, sprovvista di proteine.

Ipotesi del retrovirus

Questa ipotesi muove le sue premesse dall'osservazione, in corso di CJD, della presenza di molecole di RNA a basso peso molecolare simili a quelle retrovirali. Tuttavia, la mancata dimostrazione di particelle virali e le particolari caratteristiche fisico-chimiche degli agenti delle TSE rendono questa ipotesi scarsamente attendibile.

Teoria del virino

L'agente patogeno sarebbe costituito da un acido nucleico associato ad una proteina codificata dall'ospite. Questa teo-

ria sarebbe in grado di spiegare, al pari di quella prionica, la mancata reazione immunitaria da parte dell'organismo-ospite costantemente osservata in corso di TSE umane e animali. Una variante di questa teoria (teoria dell'oloprione) suggerisce che anche l'acido nucleico sia di origine cellulare, con la particella infettante costituita da PrP^{Sc} (apoprione) e acido nucleico (coprione) [119].

Teoria dell'amiloidosi virus-indotta

Secondo questa teoria, le TSE sarebbero sostenute da un virus la cui attività replicativa si esaurirebbe prima dell'esordio clinico della patologia, quindi le SAF sarebbero il prodotto della replicazione virale [119, 377].

La teoria prionica

Il matematico J. Griffith fu colui che, nel 1967, intuì per primo che l'agente eziologico della Scrapie e delle altre TSE fino ad allora conosciute era di natura proteica. Successivamente Prusiner, riprendendo l'ipotesi proposta da Griffith, dimostrò che le caratteristiche fisico-chimiche dell'agente della Scrapie erano molto diverse da quelle dei virus, dei viroidi e dei plasmidi, pervenendo nel 1982, alla fondamentale conclusione che tale malattia fosse sostenuta da: «una piccola particella infettante di natura proteica, resistente ai trattamenti di inattivazione in grado di modificare gli acidi nucleici». A seguito di questa memorabile scoperta egli coniò il termine "Prion" (*PR*oteinaceous *IN*fectious *ON*ly), tradotto nella nostra lingua in "prione" [378]. L'enunciazione della teoria prionica valse a Prusiner il premio *Nobel* per la Medicina nel 1997 [377].

La teoria prionica, seppur comprovata sperimentalmente, tuttavia spiegherebbe con maggiore difficoltà, rispetto alla teoria virale, l'esistenza di più ceppi di agenti di Scrapie, tutti ben caratterizzati dal punto di vista clinico, istopatologico e biochimico, fenomeno quest'ultimo difficilmente plausibile in assenza di possesso, da parte dell'agente causale, di acidi nucleici. Ciò collide, infatti, con un dogma centrale della biologia molecolare, che postula che gli agenti infettivi che trasmettono malattie debbano possedere acidi nucleici, per propagare l'infezione in un organismo ospite. La scoperta dei prioni ha dimostrato pertanto che, anche in assenza di acidi nucleici un agente di natura proteica può moltiplicarsi e provocare malattia [119].

Successivi studi hanno dimostrato che la struttura primaria del "prione" coincide con quella di una proteina normalmente espressa dall'ospite, definita "proteina prionica cellulare" (PrP^C) e codificata da uno specifico gene (il gene *PRNP*) [10, 11, 348, 377].

Furono due, però, le osservazioni cruciali che confermarono la validità della teoria prionica. La prima fu la creazione di ceppi transgenici di topi mediante delezione omozigote del gene *PRNP* (*topi "knockout"*), che, quindi, avendo perso la capacità di esprimere la PrP^C, risultavano refrattari nei

confronti della trasmissione della patologia [67]. La seconda fu l'isolamento dal tessuto cerebrale di animali affetti da TSE dell'isoforma patologica della PrP^C, nota come PrP^{Sc} [377]. Questi dati ancora oggi costituiscono le prove più solide della teoria enunciata da Stanley Prusiner.

Riassumendo quanto finora esposto, possiamo affermare che tutte le TSE sin ora scoperte siano causate da “prioni”; tali malattie presentano una particolare complessità patobiologica, poiché nel determinismo del processo lesivo che le contraddistingue, si vedono convergere un agente infettivo trasmissibile esogeno (seppur “*sui generis*”) e un fattore genetico endogeno, cioè proprio dell'ospite. Il primo di questi è costituito dall'isoforma patologica (PrP^{Sc}) della proteina prionica cellulare (PrP^C) che, secondo la teoria di Prusiner, coinciderebbe totalmente con l'agente causale [119].

Nonostante la teoria prionica sia stata ampiamente dimostrata in ambito sperimentale, anche alla luce dei postulati di Koch [269], esistono tuttora alcuni studiosi che sostengono l'ipotesi virale; gli stessi considerano la PrP^{Sc} come il prodotto patologico dell'infezione virale e non il vero e proprio agente causale [100, 303, 304, 371].

Dal punto di vista biomolecolare

La PrP^C, pur possedendo la stessa sequenza aminoacidica (struttura primaria), si differenzia dalla PrP^{Sc} per la conformazione spaziale (struttura secondaria, tipica delle proteine globulari solubili in acqua, come le albumine), nonché per la struttura terziaria e quaternaria. Infatti, mentre nella PrP^C le catene polipeptidiche hanno una struttura prevalentemente ad “ α -eliche” (40% di α -eliche e 3% di β -foglietti), le modificazioni post-traslazionali che comportano l'acquisizione di una struttura prevalentemente a “ β foglietti” (30% di α -eliche e 40% di β -foglietti) sarebbero in grado di conferire patogenicità alla molecola della PrP^{Sc}, marcando al contempo le differenze tra le due isoforme proteiche. Questi cambiamenti conformazionali conferiscono alla PrP^{Sc}, ovvero all'agente infettante (il prione), delle caratteristiche nuove: esso diviene parzialmente resistente alla proteolisi (da cui la denominazione alternativa di PrP^{res}, contrapposta a quella di PrP^{sen}, che identifica appunto la PrP^C) e insolubile in detergenti deboli e soluzioni saline [10, 11, 119, 437]. I

n effetti, ad avvalorare il concetto di “agenti biologici di natura non convenzionale”, contribuisce anche l'eccezionale resistenza dei medesimi nei confronti di agenti fisici quali calore, radiazioni eccitanti e ionizzanti, ultrasuoni, nonché di agenti chimici quali, formaldeide e glutaraldeide ed altri detergenti e disinfettanti, agenti che risulterebbero sicuramente inattivanti per i virus convenzionali. L'inattivazione, o quantomeno l'abbattimento della carica infettante (infettività) richiedono infatti l'impiego di una temperatura di 133°C a 3 bar per 20 minuti, oppure l'utilizzo di soluzioni disinfettanti clorate come l'ipoclorito di sodio (NaClO) 2% per 1 h, di idrossido di sodio (NaOH) 2N per 1 ora (o 1N per 2 ore) o idrossido di sodio (NaOH) 2M in autoclave a 121 °C per 30 minuti,

oppure di acido formico al 95-100% per 1 ora, nonché di aldeide formica (HCHO) 98% per 1 ora [119, 264].

La PrP^{Sc} 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*) o *prion rods*, evidenziabili al microscopio elettronico. Tali fibrille, di 20 nm di diametro, di 100-200 nm di lunghezza 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 [264].

Alla luce di quanto sopra, è ragionevole ritenere che l'assenza di una risposta infiammatoria ed immunitaria nei confronti della PrP^{Sc} (caratteristica comune a tutte le TSE) dipenda dal fatto che essa sia totalmente connessa alla sua controparte cellulare (PrP^C) dall'omologia della sequenza aminoacidica (struttura primaria), e per questo sarebbe riconosciuta come “*self*” da parte del sistema immunitario dell'ospite [10, 11, 119, 377, 378].

Tuttavia recenti studi di crio-elettronmicroscopia (cryo-EM) e di diffrazione a raggi X hanno consentito di caratterizzare la struttura della PrP^{Sc} intimamente connessa ad un β -solenoide a 4 gradini (4R β S) [436].

L'evento dominante che caratterizza la conversione della PrP^C in PrP^{Sc} si verifica dopo che la prima ha raggiunto la membrana cellulare, alla quale si lega mediante un legame di tipo “glicosil-fosfatidil-inositico” (*GPI-anchor*) localizzato in corrispondenza dell'estremità C-terminale della PrP^C. Più in particolare, sarebbero i due domini della struttura prevalentemente ad α -elica della PrP^C a essere coinvolti nel processo di conversione post-traslazionale nella struttura prevalentemente a β -foglietti propria della PrP^{Sc}. Questo processo di conversione, inoltre, potrebbe esser reso ben più efficiente dalla presenza di alcune particolari proteine denominate “chaperonine”, mentre è stato recentemente documentato, in tale contesto, l'intervento di reazioni di scambio fra il gruppo tiolico terminale della PrP^{Sc} e il legame disolfuro intramolecolare della PrP^C.

I meccanismi molecolari di questo processo sono stati approfonditamente studiati da Prusiner e si basano su due distinti modelli [11, 379]. Il primo modello, denominato *template-directed refolding*, prevede l'interazione tra molecole esogene di PrP^{Sc} e molecole endogene di PrP^C. La PrP^{Sc}, una volta penetrata all'interno dei neuroni e, in minor misura, negli astrociti, si localizzerebbe a livello delle cisterne dell'apparato del Golgi. Qui la PrP^C derivante dalla membrana cellulare interagirebbe con la PrP^{Sc} e così, a spese del *pool* di PrP^C, si formerebbe PrP^{Sc} che si accumulerebbe in maniera esponenziale in sede intracellulare. Si formerebbe, pertanto, una molecola eterodimerica costituita da due subunità e ciò determinerebbe la modificazione della PrP^C; alla rottura del dimero seguirebbe la liberazione di due molecole trasformate. La PrP^C, quindi, in qualche modo si denaturerebbe (perderebbe la sua strut-

tura terziaria) per poi rinaturarsi (*refold*) sotto l'influenza di una molecola di PrP^{Sc}. In condizioni di normalità, un'elevata "barriera energetica" impedirebbe la conversione spontanea della PrP^C in PrP^{Sc}. Il secondo modello, denominato "*seeded nucleation*" o "*nucleation polymerization*", prevede invece che la PrP^C e la PrP^{Sc} coesistano in un equilibrio termodinamico reversibile. Il reclutamento e l'aggregazione in fibrille amiloidi di forme monomeriche di PrP^{Sc} avverrebbero solo quando diverse molecole di PrP^{Sc}, 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^C e così via, in un processo auto catalitico responsabile del progressivo accumulo di PrP^{Sc}.

In questo secondo modello, la PrP^{Sc} diviene stabile all'interno della suddetta struttura simil-cristallina; la successiva frammentazione di aggregati di PrP^{Sc} può tuttavia aumentare il numero di nuclei (*seed*) di cristallizzazione, i quali possono a loro volta reclutare altre molecole di PrP^C 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 [10, 119, 264]. I suddetti modelli potrebbero essere validi anche per le TSE su base ereditaria, in cui singole mutazioni puntiformi a carico del gene *PRNP* porterebbero alla conversione della PrP^C in PrP^{Sc}. Caughey e Baron (2006), confermano che la conversione possa avvenire in seguito al contatto tra PrP^C e PrP^{Sc}. Si ritiene che tale processo di interazione/conversione possa avvenire sulla superficie cellulare e/o all'interno di endosomi che "sequestrerebbero" gli aggregati proteici della membrana cellulare. Inoltre, la conversione della PrP^C priva della normale "ancora" di glicosil-fosfatidil-inositolo che, come già accennato, la connette alla membrana cellulare, si ritiene possa portare all'accumulo extracellulare di sostanza amiloide.

I diversi ceppi d'agente

Uno degli aspetti più controversi della teoria prionica è rappresentato dall'esistenza di diversi "ceppi" di agente. Il concetto di ceppo, infatti, fino ad oggi è stato applicato ad agenti biologici dotati di materiale genetico proprio e risulterebbe poco appropriato riferendosi a un agente infettante dotato di natura esclusivamente proteica. Per "ceppo prionico" si intende un isolato che, se inoculato in uno stesso ospite (riferendoci in genere alla specie murina dal punto di vista sperimentale), si caratterizza per l'induzione di un fenotipo clinico-patologico diverso per durata del periodo di incubazione, profilo neuro-istolesivo e coinvolgimento di specifici distretti neuro-anato-

mici. I ceppi in genere mantengono le proprie caratteristiche fenotipiche anche a seguito di ripetute trasmissioni seriali. La prima dimostrazione dell'esistenza di differenti ceppi di prioni è stata ad opera di Pattison e Millson nel 1961, quando trasmissioni consecutive di un caso di Scrapie ovina in capre portarono alla comparsa di due distinti fenotipi clinici che si mantenevano costanti dopo trasmissione da capra a capra. I primi cinque ceppi di Scrapie vennero caratterizzati da Fraser *et al.* (1973) e ulteriori ceppi vennero scoperti grazie agli studi di Kimberlin *et al.* (1987). Successivamente, passaggi seriali di omogenati di tessuto cerebrale alberganti diversi isolati di Scrapie su topi "*inbred*" hanno portato all'isolamento di ceppi che differiscono tra loro e che mantengono costanti le loro caratteristiche quando re-inoculati nel topo [63]. Bessen e Marsh (1992), studiando due ceppi della TME del visone, fornirono importanti elementi a supporto del fatto che la specificità di ciascun ceppo derivasse dalla struttura conformazionale della PrP^{Sc}. Il trattamento con enzimi proteolitici determinava nei due ceppi in esame una differente degradazione della PrP^{Sc}, fatto che implicava l'esistenza di due diverse conformazioni della proteina, con comportamenti distinti nei confronti della degradazione enzimatica.

Tradizionalmente i ceppi sono stati caratterizzati in base alle proprietà biologiche e biochimiche. Per la caratterizzazione biologica i ceppi vengono distinti sulla base del periodo di incubazione e del profilo clinico e neuro-istolesivo dopo trasmissione in un ospite recettivo (generalmente topi da laboratorio), nonché della capacità di trasmissione a specie diverse [66, 151]. La lunghezza dell'intervallo tra l'esposizione all'agente infettivo e la fase clinica della malattia, che normalmente può superare i 2 anni in animali da laboratorio e i 10 anni nell'uomo, in condizioni sperimentali è altamente prevedibile e costante. È inoltre altamente ripetibile quando diversi gruppi di topi, omogenei dal punto di vista genetico, vengono inoculati con dosi equivalenti dello stesso ceppo di TSE. Tuttavia, differenti ceppi testati nella stessa linea di topi mostrano periodi di incubazione significativamente diversi. Il periodo di incubazione dipende, infatti, dal ceppo di agente, sebbene risulti pure influenzato da fattori genetici.

Nei topi da laboratorio, ad esempio, sono stati trovati due alleli del gene *PRNP*: *prnp-a* che presenta gli aminoacidi leucina e treonina ai codoni 108 e 189; e *prnp-b* con gli aminoacidi fenilalanina e valina agli stessi codoni [480]. Il genotipo che mostra il più breve tempo di incubazione è *prnp-a* per alcuni ceppi, ma per altri è *prnp-b* [64].

I ceppi di TSE mostrano anche differenze radicali e riproducibili nel tipo, nella gravità e nella distribuzione delle modificazioni patologiche che producono nel cervello dei topi sperimentalmente infettati [153]. Quantificando il grado di vacuolizzazione di 9 distinte aree cerebrali di sostanza grigia e 3 di sostanza bianca è possibile determinare, per ciascun ceppo, un caratteristico profilo delle lesioni ("*lesion profile*") [63,150].

I ceppi, infine, possono anche differire sulla base della diversa capacità di indurre aggregati di PrP^{Sc} morfologicamente diversi, che vanno da piccoli depositi a voluminose placche amiloidi localizzate in aree cerebrali diverse. Sebbene il tempo di incubazione e il profilo delle lesioni siano di grande utilità nel comprendere e discriminare i ceppi, la tipizzazione biologica dei ceppi pone diversi limiti: dalla variabilità della risposta individuale degli animali inoculati, ai fattori soggettivi legati all'esperienza dell'operatore che assegna il profilo delle lesioni, ai lunghi tempi di attesa e agli elevati costi relativi alla sperimentazione animale.

Sulla capacità di trasmissione a specie diverse, già in precedenza abbiamo introdotto il concetto di “barriera di specie” o “barriera di trasmissione”, alla cui conoscenza hanno contribuito gli studi su animali transgenici (topi, *in primis*) e, più recentemente, quelli effettuati sull'arvicola (*Myodes glareolus*), un roditore cui si associano elevata efficienza e ridotti tempi di trasmissione di numerosi ceppi di TSE umane e animali. A tal proposito, risultano molto interessanti una serie di studi secondo cui l'arvicola risulterebbe sensibile a vari ceppi di prioni della CJD, con risultati simili a quelli ottenuti in topi recanti il gene *PRNP* umano [345]. Secondo tale concetto, la trasmissibilità interspecifica delle TSE in condizioni sia naturali sia sperimentali dipenderebbe, a prescindere dalla via di infezione e dal tessuto utilizzati (che rappresentano comunque due fattori condizionanti l'efficienza di trasmissione), dall'omologia di struttura primaria fra PrP^{Sc}, da un lato, e PrP^C dell'ospite, dall'altro. In generale, al crescere dell'omologia di sequenza tra le due molecole a livello di determinate regioni, aumenterebbero di pari passo le probabilità di trasmissione interspecifica. Tuttavia, un'accentuata attività replicativa dell'agente infettante è stata dimostrata nel topo, pur in assenza di sintomatologia clinica, a seguito dell'infezione sperimentale sostenuta dal ceppo Sc237 di Scrapie del criceto. Ciò potrebbe mettere in discussione il concetto di “barriera di specie” almeno nella sua “classica” accezione molto incentrata su parametri clinici [119].

In passato, nel tentativo di aggirare l'ostacolo rappresentato dalla “barriera di specie”, la PrP^C di diverse specie animali è stata espressa in topi transgenici [11, 95, 414]. I modelli transgenici hanno infatti ridotto notevolmente questa barriera; ad esempio, quella presente tra il topo e l'hamster è stata efficacemente eliminata sviluppando topi recanti il gene *PRNP* [10, 380].

La caratterizzazione biochimica dei ceppi

Per quanto concerne la caratterizzazione biochimica dei ceppi, Bessen e Marsh (1992) studiando due ceppi della TME del visone trasmessi in hamster, dimostrarono che l'analisi elettroforetica della PrP^{Sc} produceva due “*pattern*” molecolari distinguibili. Il trattamento con enzimi proteolitici determinava inoltre, nei due ceppi in esame, una differente degradazione della PrP^{Sc}, implicando che la stessa potesse presentarsi in

due diverse conformazioni con un distinto comportamento nei confronti della degradazione enzimatica. Molti altri studi hanno dimostrato che i ceppi prionici possono essere distinti sulla base delle differenti proprietà biochimiche della PrP^{Sc}, permettendo un approccio molecolare alla caratterizzazione delle TSE umane ed animali [91, 208, 358]. In particolare, i parametri biochimici su cui si basa tale distinzione sono: *pattern* di glicosilazione della PrP^{Sc}; dimensioni e peso molecolare dei frammenti di PrP^{Sc} proteinasi k-resistenti [346]. Possedendo due distinti siti di glicosilazione, ogni singola catena polipeptidica della PrP^{Sc} può presentarsi in forma di-glicosilata, mono-glicosilata a livello di uno dei due succitati siti oppure non-glicosilata [119]. La stessa PrP^{Sc} ha la caratteristica di essere parzialmente resistente alla digestione proteolitica con proteinasi K (PK), ragion per cui una porzione verrebbe “clivata” mentre quella residua risulterebbe resistente (PrP^{res}). L'analisi elettroforetica della PrP^{Sc} a seguito di trattamento con PK mette quindi in evidenza tre bande proteiche, corrispondenti alle forme di-, mono- e non glicosilate della proteina. Il rapporto tra le suddette forme di PrP^{Sc} (“glicotipo”) varia a seconda del ceppo in questione [119, 346].

Al fine di conciliare l'esistenza, in natura, di molteplici ceppi di agente delle TSE in assenza di acido nucleico [398], gli aggregati di PrP^{Sc} sarebbero in grado di codificare e trasmettere le informazioni insite in distinte proprietà biologiche all'interno della stessa sequenza aminoacidica, mentre la PrP^C sarebbe in grado di acquisire fedelmente queste informazioni durante la sua conversione in PrP^{Sc} [43, 446]. Secondo il succitato modello la PrP^{Sc} agirebbe da stampo nella replicazione delle nascenti molecole di PrP^{Sc}. In accordo con tali presupposti, i diversi ceppi devono essere pertanto capaci di mantenere le diverse proprietà iscritte nella PrP^{Sc} e queste differenze a livello molecolare dovrebbero quindi tradursi nelle distinte peculiarità proprie di ciascun ceppo [91, 345, 446]. I prioni sarebbero dunque in grado di “ricapitolare” le loro proprietà ceppo-specifiche nella struttura terziaria e/o quaternaria della PrP^{Sc} [119, 346].

È stato altresì dimostrato che la stabilità conformazionale della PrP^{Sc} in presenza di agenti denaturanti caotropici, quali la guanidina o l'urea, varia enormemente tra diversi ceppi [367]. Utilizzando questa metodica denominata *Conformational Stability Assay* (CSA), è stato possibile monitorare variazioni della stabilità proteica associata a cambiamenti del fenotipo del ceppo dopo trasmissione in adeguati modelli sperimentali [368].

In alcuni casi, le differenze nel profilo immunobiochimico sono ben evidenti e utili per la caratterizzazione dei ceppi [10, 11, 377], come è avvenuto, ad esempio, a proposito della distinzione tra l'agente della sCJD e quello della vCJD [91]. In altri casi la distinzione tra i vari ceppi risulterebbe più difficoltosa e deve prendere in considerazione una serie di variabili.

In alternativa, le suddette proprietà potrebbero anche risiedere nelle differenti conformazioni spaziali che la PrP^{Sc} può assumere

[12]. A tal proposito, meritano grande attenzione i risultati degli studi prodotti da Christina Sigurdson *et al.* (2007), i quali hanno proposto di caratterizzare i ceppi attraverso l'impiego di "polimeri luminescenti" in grado legarsi alla PrP^{Sc} emettendo radiazioni luminose a diversa lunghezza d'onda a seconda della conformazione tridimensionale che assumono.

La possibilità di distinguere i diversi ceppi di agente delle TSE si è concretizzata anche grazie ai traguardi scientifici raggiunti negli ultimi anni. A tal proposito, i sensibili progressi registrati nel campo delle indagini immunobiochimiche basate sull'impiego della tecnica del *Western Blotting* (WB) hanno dato un notevole contributo nella discriminazione tra i diversi ceppi. Il WB, infatti, è stato impiegato per calcolare i differenti rapporti quantitativi fra le 3 bande che compongono la PrP^{Sc} [492]. Xanthopoulos *et al.* (2009) hanno invece dimostrato che, oltre alle già documentate differenze nella mobilità elettroforetica al WB, sarebbe possibile differenziare i vari ceppi utilizzando la lecitina, una proteina legante lo zucchero, discriminando quindi i ceppi di TSE in base alle caratteristiche degli zuccheri legati alla molecola della PrP^{Sc}. Un ulteriore studio condotto nel 2011 sottolinea altresì la possibilità di discriminare alcuni ceppi di Scrapie classica (CH1641 e CH1641-like), atipica (Nor98) e BSE (sperimentalmente indotta) su base molecolare nei piccoli ruminanti. In questo studio è stato sviluppato un nuovo saggio di stabilità conformazionale basato sulla solubilità differenziale di PrP^C e PrP^{Sc}, denominato *Conformational Stability and Solubility Assay* (CSSA). Più in particolare, il lavoro anzidetto riporta la messa a punto di un WB più discriminante, basato sulla denaturazione con GdnHCl e sull'utilizzo di anticorpi monoclonali, in maniera tale da differenziare i ceppi CH1641 e CH1641-like dal ceppo Nor98 e da quello responsabile della BSE nella pecora e nella capra [370].

Negli ultimi anni lo sviluppo di *test* innovativi *in vitro* ha permesso di ampliare gli orizzonti riguardanti la caratterizzazione dei ceppi di TSE, in quanto più rapidi e convenienti dal punto di vista economico rispetto alle prove biologiche su animali da laboratorio. Questo approccio è basato sulla scelta di cloni cellulari in grado di sostenere la replicazione specifica di alcuni ceppi [299]. A tal proposito, inoltre, studi condotti sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato che la reattività dei fattori del complemento differirebbe al variare del ceppo in questione [190]. La possibilità di ottenere la replicazione prionica su colture cellulari si è materializzata nel 2008 in uno studio in cui i prioni dell'arvicola e del topo sono stati replicati su cellule renali di coniglio (RK 13) modificate geneticamente mediante l'inserimento al loro interno del gene *PRNP* di una specie [99].

Infine, la tecnica PMCA (*Protein Misfolding Cycling Amplification*) è una metodica molto promettente che permette di riprodurre *in vitro* diversi aspetti della biologia dei prioni, offrendo un modello adatto per lo studio di nuove generazioni di prioni mediante cicli di amplificazione della PrP^{Sc} presente.

Questa tecnica ha permesso di dimostrare come l'infettività prionica possa essere replicata *in vitro* mantenendo nella nuova generazione di prioni le proprietà strutturali, biochimiche e biologiche di quelli di origine, insieme alla capacità di infettare animali recettivi [78].

Il limite di questa metodica è però quello di generare falsi positivi legati alla comparsa di PrP^{Sc} in seguito ad eventi di *cross*-contaminazione in alcune fasi delicate quali, ad esempio, fasi di sonicazione e d'incubazione. Da ciò deriva che questa tecnica richiede l'utilizzo di condizioni sperimentali strettamente controllate e la giusta cautela nell'interpretazione dei risultati ottenuti [95].

La proteina prionica cellulare (PrP^C)

Gli studi condotti nel corso degli anni hanno rivelato che la PrP^C assume un ruolo fondamentale nell'eziopatogenesi delle TSE. Ciò ha spinto molti ricercatori ad acquisire ancora maggiori informazioni su questa molecola proteica, cercando di comprenderne l'esatto ruolo fisiologico, al fine di eliminare i dubbi che ad oggi riguardano i processi post-traslazionali, a cui fa seguito l'accumulo di PrP^{Sc}.

La PrP^C è una sialoglicoproteina del peso molecolare di 30-35 KDa, costituita da 256 aminoacidi (nella specie ovina), provvista di un ancoraggio di glicosil-fosfatidil-inositolo ("GPI-*anchor*") attraverso il quale si lega ai fosfolipidi delle membrane cellulari e che contiene due distinti siti di glicosilazione (Asn/Glu nelle posizioni 181 e 197) ed è presente nelle cellule in 3 diverse glicoforme ("glicotipi"), rispettivamente di- mono e non-glicosilate [169, 492].

La PrP^C viene sintetizzata a seguito della trascrizione e successiva traduzione dell'informazione presente nel gene *PRNP* dell'ospite [377]. La sequenza aminoacidica che definisce la struttura primaria di tale proteina, codificata dal suddetto gene varia, ovviamente, in relazione alla specie animale in questione [119]. La via biosintetica seguita dalla PrP^C è simile a quella di altre proteine di membrana secrete, coinvolgendo il reticolo endoplasmatico (RE), a livello del quale la sequenza aminoacidica primaria viene assemblata grazie a strutture ribosomiali, con il successivo transito attraverso l'apparato del Golgi, ove la proteina subisce un processo di "maturazione" attraverso modifiche post-traslazionali, e la sua espressione finale sulla membrana plasmatica cellulare [482].

Al pari di altre proteine ancorate alla superficie cellulare tramite GPI, la PrP^C risiede su certi "microdomini di membrana" ("*membranous microdomains*", MM) ricchi in colesterolo e denominati "*rafts*", interagendo fortemente, a tale livello, con componenti quali il distroglicano, l'enzima "ossido nitrico sintetasi" ("*nitric oxide synthase*", NOS) ed i recettori per il complemento (CD21/35) e per la laminina (37-kDa/67-kDa LRP/LR). Quest'ultima interazione, in particolare, può essere sia di tipo diretto, sia mediata dal legame della PrP^C con un proteoglicano (eparan-solfato-proteoglicano), che si comples-

Novità

a cura di
Dante Marco De Faveri e Giorgia Spigno

INGREDIENTI ALIMENTARI Guida all'utilizzo



Autori:

Ernesto Carrega, Danilo De Faveri, Luca Fiori, Mauro Massari,
Laura Principato, Donato Smaldone, Giorgia Spigno



INGREDIENTI ALIMENTARI Guida all'utilizzo

A cura di
Dante Marco De Faveri
Giorgia Spigno

Autori:

Ernesto Carrega, Danilo De Faveri,
Luca Fiori, Mauro Massari, Laura Principato,
Donato Smaldone, Giorgia Spigno

Edizione Ottobre 2019

136 pagine

Illustrazioni b/n

Brossura 160 x 240 mm

Prezzo di copertina € 18,00

Prezzo abbonati* € 15,30

ISBN 9788899211493



Il manuale "Ingredienti alimentari - Guida all'utilizzo" rappresenta uno strumento utile sia per i professionisti che, direttamente o indirettamente, si occupano della produzione di alimenti, sia per gli studenti dei corsi di laurea che trattano di tecnologie alimentari. Il testo, pur se non esaustivo, presenta i principali ingredienti impiegati nell'industria alimentare, descrivendone i processi produttivi e le caratteristiche chimico-fisiche, accompagnate da modalità applicative, utili per un loro corretto impiego al fine di ottimizzarne i risultati. L'approccio utilizzato è quello oggi richiesto dai più innovativi sviluppi scientifico-tecnici del settore e si basa, non tanto sul criterio di filiera, quanto, piuttosto, su quello sistemico, privilegiandone l'aspetto multidisciplinare, tipico dell'ingegneria di processo al quale le tecnologie alimentari appartengono. Infine, particolare attenzione è stata posta alla sostenibilità dedicando un intero capitolo al recupero di ingredienti naturali da sottoprodotti dell'industria agro-alimentare, in particolare di quella enologica, con il duplice scopo di proteggere l'ambiente e di salvaguardare le risorse, secondo il noto principio di reciprocità.



Via Eritrea 21 | 20157 Milano

PER ORDINARE IL VOLUME

☎ direttamente on line sul sito www.pointvet.it

@ invia una mail a: diffusionelibri@pointvet.it

☎ telefona allo 02 | 60 85 23 32

(dal lunedì al venerdì dalle 9.00 alle 13.00 e dalle 14.00 alle 18.00)

sarebbe a sua volta con la proteina attraverso due distinti siti di legame [119].

Sebbene la PrP^C risulti particolarmente abbondante a livello della membrana plasmatica legata ai “rafts” lipidici, una quota di tale proteina sarebbe riscontrabile all’interno di canali rivestiti di clatrina, attraverso i quali subirebbe un processo di endocitosi. Da qui può essere nuovamente riportata sulla superficie cellulare tramite specifiche proteine di trasporto e quindi riciclata, oppure può essere indirizzata all’interno dei lisosomi per la definitiva degradazione [482].

L’impiego della spettroscopia in risonanza magnetica nucleare (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) ha permesso di studiare approfonditamente la struttura definitiva della PrP^C dal punto di vista molecolare. Nelle diverse specie animali considerate, quali topo, uomo, criceto, ruminanti selvatici (cervo ed alce) e domestici (bovini, ovini e caprini), è stato osservato che questa proteina appare costituita da due domini non esattamente correlati tra loro; il dominio N-terminale (residui 23-128), e il dominio C-terminale (residui 123-231) che comprende, a sua volta, tre catene ad α -elica, rispettivamente $\alpha 1$ (residui 144-154), $\alpha 2$ (residui 179-193) e $\alpha 3$ (residui 200-217), nonché due catene anti-parallele a β -foglietto, $\beta 1$ (residui 128-231) e $\beta 2$ (residui 161-164), che si localizzano accanto alla prima α -elica [27].

La seconda e la terza α -elica sono connesse da un ponte disolfuro (S-S) di circa 35 aminoacidi compreso tra i residui Cys 179 e Cys 214 [389], così come la seconda catena a β -foglietti e la seconda α -elica lo sono per mezzo di un’ansa (*loop*) [176]. Questo *loop* (residui aminoacidici 166-175), particolarmente flessibile nella maggior parte delle specie animali, risulta invece rigido nei cervidi, un dato che spiegherebbe la loro elevata suscettibilità nei confronti della CWD [8, 119, 424].

Inoltre, la conformazione e la composizione in aminoacidi del suddetto *loop* potrebbero avere un ruolo determinante nella costituzione della “barriera di specie” o “barriera di trasmissione”, come testimoniato da recenti studi effettuati soprattutto nella specie murina [24].

L’estremità N-terminale della PrP^C sembra invece poco strutturata, con una morfologia a “coda flessibile”, sebbene contenga due regioni conservate ben definite. La prima è formata da un octapeptide ripetuto per 5-11 volte; questa regione sembra essere importante nel legame con gli ioni rame (Cu^{++}) e potrebbe essere coinvolta nella patogenesi delle malattie da prioni. La seconda, a valle rispetto alla prima regione, contiene un profilo altamente idrofobico e conservato, che era stato originariamente chiamato “regione trans-membranaria”. Tuttavia, poiché non è noto se questo dominio davvero funzioni come regione trans-membranaria in condizioni fisiologiche, attualmente è stato più propriamente definito “*core idrofobico*” [8]. L’estremità C-terminale presenta, a sua volta, una morfologia simile alle proteine globulari, risultando stabilizzata, come già anticipato, da un ponte disolfuro che lega la seconda e la terza α -elica. Questo dominio è stato oggetto di studio per diversi

motivi, in particolare sia perché è risultato letale se espresso in topi transgenici [377], sia perché contiene la maggior parte dei siti in cui si verificano mutazioni puntiformi collegate alla comparsa, nelle TSE umane, di forme familiari.

La NMR ha dimostrato che queste mutazioni si verificherebbero all’interno di questa regione molecolare, oppure in siti direttamente adiacenti. Infine, la presenza dei β -foglietti all’interno di questo dominio era in contrasto con i modelli strutturali previsti fino ad allora, che si basavano su un modello totalmente ad α -elica della PrP^C e ciò poteva essere importante per l’avvio della trasformazione della PrP^C nella sua isoforma patologica, la PrP^{Sc} [389].

L’espressione della PrP^C

L’espressione della PrP^C ha inizio nella vita embrionale, ma raggiunge il suo massimo livello in età adulta.

Negli adulti, alti livelli si rinvenivano nel SNC (prevalentemente sulla membrana dei neuroni e degli astrociti), nonché in organi e tessuti linfoidi secondari. In questi ultimi la PrP^C risulta particolarmente espressa dalle cellule follicolari dendritiche (*Follicular Dendritic Cells*, FDCs), con più marcati livelli di espressione documentati in animali di giovane età [309].

Negli altri tessuti periferici un evidente *pattern* di espressione della PrP^C è stato evidenziato in linfociti, cellule endoteliali, cellule epiteliali e in cellule progenitrici della linea eritroide, mentre milza, linfonodi, polmone, miocardio, rene, muscolatura scheletrica, utero, ghiandole surrenali e paratiroidi, prestomaci e abomaso, intestino e ghiandola mammaria costituirebbero ulteriori distretti in cui è stata osservata una più o meno elevata espressione della PrP^C [11, 81, 213].

Le funzioni biologiche della PrP^C

Tali funzioni rimangono tuttora in buona parte oscure. I numerosi esperimenti effettuati su modelli murini transgenici, cioè privati del gene *PRNP* (*Prnp^{-/-}*), hanno dimostrato che la mancata espressione della PrP^C da parte dell’ospite non consente né la replicazione dell’agente né la comparsa e la successiva evoluzione della malattia [55, 67, 68, 399]. La presenza della PrP^C sarebbe pertanto da considerarsi un prerequisito indispensabile nella patogenesi delle TSE [68, 377, 380]. D’altro canto, l’iper-espressione della PrP^C a livello di SNC sarebbe in grado di ridurre notevolmente il periodo di incubazione nell’infezione sperimentale [138, 413].

Dal punto di vista biologico-funzionale la PrP^C è una metallo-proteina in grado di legarsi con affinità differenti a vari tipi di metalli pesanti. Si lega infatti, con un elevato grado di affinità, a ioni quali rame (Cu^{++}) e zinco (Zn^{++}), e, seppur con minore affinità a manganese (Mn^{++}) e nichel (Ni^{++}). Il legame con il rame avverrebbe mediante il coinvolgimento dell’aminoacido istidina, localizzato all’interno della regione octapeptidica (*Octapeptide region*) del dominio N-terminale, anche se studi recenti hanno rivelato la presenza di altri siti leganti il rame [119]. Poiché il dominio N-terminale è anche

coinvolto nel legame della PrP^C con un certo numero di ligandi proteici, è stato ipotizzato che il rame possa giocare un ruolo strutturale e influenzare il legame della PrP^C a queste altre proteine. A sostegno del possibile ruolo fisiologico della PrP^C nel regolare l'omeostasi del rame, è stato dimostrato che topi transgenici (*Prnp*⁺) mostrano una concentrazione di rame del 50% inferiore all'interno di frazioni sinaptosomali rispetto a topi "wild type". Questo suggerisce che la PrP^C potrebbe essere coinvolta nella regolazione delle concentrazioni di rame nella regione sinaptica dei neuroni, ad esempio giocando un ruolo nell'"uptake" del rame nelle fibre presinaptiche. Inoltre è stato dimostrato che l'endocitosi della PrP^C, attraverso vescicole rivestite di clatrina, è stimolata quando il rame viene aggiunto a colture cellulari di neuroblastoma, suggerendo che questa internalizzazione potrebbe essere coinvolta nel trasporto del rame dal compartimento extracellulare a quello intracellulare [22].

È stato altresì ipotizzato che la PrP^C 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 [36]. Qin et al. (2009) hanno riportato che in cellule murine neuro-2a e in cellule umane HeLa elevati livelli di rame indurrebbero una sovraespressione della PrP^C; il significato di ciò sarebbe da ricercare nella protezione, da parte della stessa PrP^C, della cellula nei confronti dello stress ossidativo, giocando un ruolo nella modulazione della concentrazione del rame intracellulare.

Infine, è stato recentemente dimostrato che le cellule capaci di esprimere maggiori livelli di PrP^C sarebbero più resistenti al sovraccarico cronico da metalli pesanti quali rame, zinco, manganese e nichel e quindi anche più resistenti nei confronti dello stress ossidativo indotto dagli stessi, rispetto alle controparti cellulari che esprimono poco o affatto la PrP^C [374]. Ciò troverebbe il suo fondamento, seppur in parte, nell'alterata omeostasi del glutatione (GSH), uno dei principali regolatori dello stato "redox" cellulare e contribuirebbe altresì a spiegare l'alterata risposta e l'aumentata suscettibilità allo stress ossidativo, da parte dei neuroni, in corso di TSE [264].

La localizzazione della PrP^C sulla membrana citoplasmatica ha permesso di ipotizzare il coinvolgimento di tale proteina in funzioni di adesione inter-cellulare, nel mantenimento della plasticità sinaptica [298, 442], nonché in fenomeni di trasduzione di segnali cellulari [340] e di differenziazione e proliferazione cellulare. Ad esempio, alcuni Autori hanno dimostrato il legame funzionale della PrP^C con l'enzima fosfatidil-inositolo 3-chinasi (PI-3K), una protein-chinasi coinvolta nella sopravvivenza cellulare [242], mentre altri studi, effettuati sia *in vitro* (linee cellulari) che *in vivo* (topo), hanno dimostrato che le cellule che esprimono la PrP^C posseggono livelli di PI-3K più elevati rispetto alle stesse cellule che esprimono bassi livelli di PrP^C [470]. Inoltre, la PrP^C ha mostrato la capacità di tra-

sdurre segnali cellulari neuroprotettivi attraverso l'attivazione di protein-chinasi A AMP ciclico-dipendenti (cAMP-PKA) quali, la tirosina protein-chinasi Fyn (FYN) e molte altre [83]. Recentemente è stato riportato che la PrP^C possa giocare un ruolo nello sviluppo, nell'attivazione e nella proliferazione dei linfociti T [314] e, sebbene ne sia stato ampiamente dimostrato l'elevato livello di espressione in cellule del sistema immunitario, quali le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DCs), così come in monociti, piastrine, cellule natural killer (*Natural Killer Cells*, NKs), linfociti B e linfociti T, la stessa subirebbe una "up-regulation" durante l'attivazione dei linfociti della linea T e, ancora di più, durante la differenziazione delle cellule NKs [310]. Come noto, le FDCs mostrano elevati livelli di espressione della PrP^C, tuttavia è stato dimostrato che topi con FDCs deprivate di PrP^C (*PrP*^{C-/-}) non hanno presentato alcuna alterazione nella maturazione o nella funzionalità di tali cellule indicando pertanto che elevati livelli di espressione della proteina non sarebbero essenziali in questo contesto [319]. D'altro canto, è stato dimostrato che la PrP^C svolgerebbe un ruolo importante nella fagocitosi. In particolare, i macrofagi PrP^{C-/-} hanno un'attività fagocitaria più elevata sia *in vivo* che *in vitro*. Pertanto, la PrP^C regolerebbe negativamente la fagocitosi. A sostegno di ciò, diversi gruppi di ricerca hanno dimostrato che gli animali *Prnp*^{-/-} sarebbero più resistenti alle infezioni sperimentali sostenute da *Brucella abortus* (7) da *Mycobacterium bovis* e da ceppi neurotropi di *Herpes Simplex Virus* (HSV). Al contrario, topi transgenici iper-esprimenti la PrP^C (Topi Tga 20) risulterebbero altamente suscettibili nei confronti dell'infezione da HSV [450]. Tutto questo potrebbe essere correlato al fatto che i macrofagi mostrano fisiologicamente livelli di PrP^C estremamente bassi e solitamente inferiori ai limiti di rilevamento [106].

Molto interessanti appaiono i risultati di lavori svolti da diversi gruppi di ricerca sulla possibile attività citoprotettiva esplicata dalla PrP^C, in particolare nei confronti di quei fattori interni e ambientali che inducono la cellula ad avviare il programma apoptotico. Gli studi condotti *in vivo* hanno infatti dimostrato che l'assenza della PrP^C nei neuroni dell'ippocampo indurrebbe la morte cellulare programmata negli stessi [391].

Uno degli esempi più illuminanti in un siffatto contesto sarebbe la documentata capacità della proteina di proteggere i neuroni fetali umani in coltura contro l'apoptosi indotta dall'anti-oncogene *Bax*. Quando queste cellule sono state inoculate con un plasmide codificante per il *Bax*, circa il 90% di esse sono andate incontro ad apoptosi; al contrario quando i neuroni sono stati inoculati sia con plasmidi codificanti per *Bax*, sia con plasmidi codificanti per PrP^C, la percentuale di cellule apoptotiche era ridotta a circa il 10% [52, 392].

Nuove informazioni in tal senso ci sono pervenute da uno studio di Laroche-Pierre *et al* (2009), i quali hanno dimostrato con successo che la terza α -elica della PrP^C sarebbe indispensabile per lo svolgimento di una specifica funzione anti-*Bax*, quindi anti-apoptotica. I meccanismi biochimici attraverso i quali la



PrP^C proteggerebbe la cellula, inibendone, di fatto, il processo apoptotico, sono molteplici e si basano tutti sulla corretta conoscenza del gene *Bax*. In primo luogo, il “GPI-*anchor*” della PrP^C potrebbe interagire con un recettore trans-membranario, avviando così una cascata di trasduzione del segnale. Questa cascata potrebbe quindi alterare l’attività di *Bax* direttamente, per esempio inibendo la sua traslocazione mitocondriale o inducendone un cambiamento conformazionale. Questi stessi effetti potrebbero anche essere il risultato di una interazione fisica tra *Bax* e “diverse” forme citoplasmatiche di PrP^C. In alternativa, un segnale PrP^C-dipendente potrebbe agire a monte di *Bax*, causando sia l’inibizione di mediatori pro-apoptotici come *BH3* che attivano il gene *Bax* sia una maggior associazione di *Bax* con i regolatori anti-apoptotici, quali *Bcl-2* o *Bcl-XL*. Un’altra possibilità è che la PrP^C agisca a valle di *Bax* sopprimendo il rilascio di fattori in grado di innescare l’apoptosi, quali il citocromo C, APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) e caspasi. Infine, la PrP^C potrebbe anche interferire nel rilascio di ioni calcio (Ca^{++}), indotto da *Bax*, dal reticolo endoplasmatico, legandosi presumibilmente ad un recettore di membrana [482].

Ulteriori studi condotti su topi transgenici hanno permesso di identificare un nuovo gene, denominato *PRND*, e codificante, a sua volta, per una proteina simil-prionica denominata *Doppel* (Dpl) e già prodotta nel corso della vita embrionale, ma i cui livelli di espressione a livello di SNC sarebbero, al contrario della PrP^C, estremamente ridotti [337]. Livelli di espressione dell’ mRNA di Dpl d’entità ben più marcata sarebbero invece presenti a livello di testicolo, cuore e, in minor misura, a livello di milza, ovaio, muscolatura scheletrica e, limitatamente alla prima settimana di vita nel topo, anche a livello degli endoteli vasali del SNC, della mucosa intestinale e della milza, informazione quest’ultima da cui discende peraltro l’ipotesi che la proteina Dpl sia coinvolta nella maturazione della barriera emato-encefalica. Tale proteina, strutturalmente, funzionalmente e biologicamente correlata alla PrP^C, risulta costituita nella specie murina da 179 aminoacidi ed è codificata da un gene (*Prnd*) localizzato sullo stesso cromosoma in cui risiede il gene codificante per la PrP^C, ad una distanza compresa fra 12 e 21 kb a seconda della specie animale in causa. Recenti studi hanno consentito di identificare, a livello del gene *Prnd* ovino e bovino, la presenza di due esoni (a differenza dei

corrispondenti geni dell'uomo e del topo, che ne conterrebbero), nonché di caratterizzare una serie di polimorfismi “non silenti” (in posizione 50, 110 e 132) a livello della regione codificante del gene bovino, ma non di quello ovino (in cui sono state descritte solo due sostituzioni “silenti” in posizione 12 e 26), senza che sia stata peraltro stabilita alcuna significativa correlazione fra presenza dei suddetti polimorfismi, da un lato, ed accresciuta o ridotta suscettibilità alle TSE nelle due specie in oggetto, dall'altro [87,119, 442, 457].

Alcuni studiosi hanno avanzato l'ipotesi che la proteina Dpl possa esplicare, al contrario della PrP^C, una funzione pro-apoptotica, teoria quest'ultima avvalorata dal dato secondo cui essa sarebbe in grado, qualora sintetizzata in quantità eccessive, di causare atassia locomotoria, inducendo la comparsa di lesioni neurodegenerative praticamente sovrapponibili a quelle prodotte dalla stessa PrP^{Sc} [390, 442].

Uno studio condotto su topi transgenici ha dimostrato, inoltre, che la proteina Dpl sarebbe in grado di innescare non solo il processo apoptotico, ma anche quello autofagico [202].

Per quanto concerne, infine, i rapporti intercorrenti tra Dpl e PrP^C, [400] ha dimostrato che la delezione all'interno della PrP^C dei residui amino-terminali in posizione 23-88 renderebbe inefficace la sua azione inibitrice nei confronti della proteina Dpl, promuovendone, conseguentemente, il suo effetto pro-apoptotico. Inoltre, applicando la stessa delezione in posizione 121 o 134, la PrP^C acquisirebbe un'attività neurotossica simile a quella esplicita dalla proteina Dpl. Tuttavia, negli ultimi anni alcuni ricercatori, utilizzando analisi genetiche ed immunologiche, hanno scoperto che la regolazione della fagocitosi di cellule apoptotiche da parte di macrofagi, precedentemente attribuita alla PrP^C, sarebbe invece controllata da un *locus* collegato con il gene *PRNP* codificante per una α -proteina regolatrice di segnale (*Signal Regulatory Protein α* , SIRPA). Ciò testimonierebbe che la modulazione della fagocitosi sarebbe stata, in passato, erroneamente attribuita a PrP^C, illustrando al contempo la necessità di approcci futuri e più rigorosi per limitare o eliminare del tutto i margini di errore indotti dalla contiguità funzionale tra geni diversi [347, 394].

È stato ampiamente dimostrato che la PrP^C svolge un ruolo neuroprotettivo in corso di lesioni ischemiche cerebrali precoci attraverso meccanismi specifici. Le chinasi regolate da segnali extracellulari (*Extracellular Signal-Regulated Kinases*, ERK), un importante gruppo di proteine note per esacerbare il danno su base ischemica, sono state introdotte per identificare gli effetti della PrP^C sulla morte cellulare ischemica. In particolare, è stato osservato che in topi transgenici *Prnp*^{-/-}, l'aumento dell'espressione di ERK 1 e ERK 2 rappresenta una risposta precoce al danno cerebrale ischemico [441] e, conseguentemente, è stato evidenziato che in topi sovraespressanti, al contrario la PrP^C, i livelli di attivazione post-ischemica di ERK 1 e ERK 2 risulterebbero diminuite, contemporaneamente, le dimensioni delle lesioni infartuali significativamente si ridurrebbero [476].

Studi elettrofisiologici effettuati *in vivo* su topi *Prnp*^{-/-} hanno, inoltre, evidenziato che la PrP^C influenzerebbe una serie di processi all'interno del SNC. Questi studi hanno dimostrato, in particolare, una serie di anomalie funzionali, in primo luogo con riduzione della trasmissione sinaptica, GABA-mediata, a livello di recettori dell'ippocampo; in secondo luogo, con un'attenuazione del potenziamento a lungo termine, cioè la trasmissione di segnali di lunga durata tra neuroni coinvolti nei processi di apprendimento e di memorizzazione [442]. Negli ultimi anni risultano sempre più importanti le prove a supporto del ruolo della PrP^C nello sviluppo, la differenziazione e la metastatizzazione di tumori. È stato dimostrato, infatti, che la PrP^C risulta altamente espressa in tumori a carico di numerosi organi tra cui pancreas, stomaco, mammella, prostata e colon-retto, nonché in neoplasie chemio-resistenti della ghiandola mammaria e dello stomaco [189, 272, 273].

La PrP^C, infine, potrebbe svolgere un potenziale ruolo nella patogenesi di malattie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer. Le cause della malattia sono molto complesse, ma una delle ipotesi propone che il deposito di placche amiloidi extracellulari (*proteina amiloide β* , A β_{40-42}) potrebbe innescare fenomeni di disfunzione neuronale fino alla morte cellulare [69]. Diversi Autori hanno dimostrato la presenza di un'interazione “ad elevata affinità” tra oligomeri di A β_{40-42} e PrP^C. Questa interazione giocherebbe un ruolo importante nella tossicità di A β_{40-42} a livello sinaptico, causando danni alle membrane cellulari unitamente al rilascio di vescicole sinaptiche contenenti ioni Ca^{++} e conseguente aumento di questo ione a livello intracellulare [369]. Inoltre, ad accomunare le TSE con le sindromi neurodegenerative da “*misfolding proteico*” quali la malattia di Alzheimer, il morbo di Parkinson, la malattia di Huntington, l'atassia/atrofia spino-cerebellare e molte altre, non interverrebbero soltanto le evidenze a supporto dei comuni denominatori neuro-patogenetici, ma anche le loro caratteristiche cliniche. Il morbo di Alzheimer per esempio, analogamente alle malattie da prioni umane decorrerebbe con una sintomatologia psichiatrica e neuro-comportamentali caratterizzata da depressione ed ansia [451].

È stato ipotizzato che il sistema monoaminergico e, in particolare, quello serotoninergico, possano svolgere un ruolo cruciale nell'insorgenza dei predetti sintomi ed è stato dimostrato altresì che topi *Prnp*^{-/-} mostrano comportamento aggressivo oltre a disturbi del sonno, rispetto ai topi “*Wild Type*” [156]. Recentemente, è stato anche documentato che la PrP^C regolerebbe il funzionamento dei sistemi monoaminergici. È stato ipotizzato, a tal proposito, che la progressiva perdita di funzione della PrP^C, nel lungo decorso delle succitate malattie neurodegenerative, possa interferire con i circuiti monoaminergici, con la conseguente comparsa delle manifestazioni neuro-psichiatriche proprie di queste malattie [156].

Le basi genetiche della suscettibilità/resistenza alle TSE con riferimento alla Scrapie ovina

L'esistenza di fattori genetici dell'ospite in grado di modulare la suscettibilità e la resistenza nei confronti delle TSE è conosciuta oramai da molto tempo. Già nel corso degli anni '60, infatti, Parry riteneva che la Scrapie ovina rientrasse in una «particolare categoria di malattie genetiche nelle quali l'agente causale sarebbe una piccola particella, dotata di potere patogeno ed in grado di replicare autonomamente, che risentirebbe dell'azione svolta fisiologicamente da un determinato gene dell'ospite» [4, 169].

A tal proposito, è importante ricordare che il fenotipo clinico-patologico che si osserva in presenza di Scrapie come di altre TSE animali ed umane, sia spontanee che sperimentali, costituirebbe il prodotto dell'interazione tra il ceppo di agente responsabile ed il genotipo dell'ospite [119].

Le basi genetiche delle malattie da prioni risiedono nell'esistenza, nel genoma di tutti i vertebrati e di molti altri organismi viventi, compresi quelli zoologicamente meno evoluti, del gene *PRNP* (in passato denominato *Sip*, da *Scrapie incubation period* e *Sinc* da *Scrapie incubation*, rispettivamente nella pecora e nel topo) che codifica per la PrP^C. In alcune specie quali uomo, topo, pecora, capra e in alcuni cervidi sensibili alla CWD, sono stati identificati numerosi "polimorfismi" genetici in corrispondenza di determinate posizioni della sequenza nucleotidica del gene *PRNP*, in particolare della sua regione biologicamente attiva (*Open Reading frame*, ORF). Il gene *PRNP* è stato mappato sul cromosoma 20 dell'uomo [437] e sul cromosoma 13 nella specie ovina, caprina e bovina e la sua porzione "funzionale", di lunghezza pari a 21 kb, è formata da tre esoni. Gli esoni I e II hanno dimensioni ridotte e formano l'estremità 5' (non codificante) del trascritto. L'esone III (circa 4 kb) contiene l'intero ORF e codifica per l'estremità 3' del trascritto. L'ORF del gene *PRNP* dei bovini, dei cervidi e degli ovini ha una lunghezza pari a 256 codoni [169].

Sono state descritte, in proposito, oltre 40 diverse configurazioni alleliche del gene *PRNP* nella specie ovina (*Ovis aries*) e 22 distinti alleli del medesimo gene nella specie caprina (*Capra hircus*). In totale, ben 39 dei 256 codoni (15%) si sono dimostrati polimorfici. Alcuni di questi siti polimorfici, tuttavia, è possibile che risiedano nei peptidi di segnale dei domini N-terminale e C-terminale, che subiscono il clivaggio durante la maturazione della PrP^C. Nella specie ovina, gli alleli del gene *PRNP* vengono convenzionalmente indicati facendo riferimento a tre codoni [136, 154, 171], i quali sono fondamentali nella modulazione della suscettibilità/resistenza dell'ospite nei confronti sia della Scrapie che della BSE sperimentalmente trasmessa: A136V/T, R154H/L, Q171R/H/K. In ragione di ciò, è possibile pertanto affermare che l'allele ARQ, il

quale mostra al codone 136 l'aminoacido alanina (A), al codone 154 l'aminoacido arginina (R) e al codone 171 l'aminoacido glutammina (Q), sarebbe da ritenere l'allele ancestrale. Le combinazioni di questi polimorfismi che si verificano a livello dei tre sopra citati codoni (A136V/T, R154H/L, Q171R/H/L) danno origine a 5 diverse configurazioni alleliche (ARR, ARH, ARQ, AHQ e VRQ), che conferiscono a loro volta vari gradi di suscettibilità/resistenza nei confronti della malattia. L'allele VRQ è quello associato ad una maggiore suscettibilità alla Scrapie, mentre l'allele ARR ad una condizione di spiccata resistenza [38, 130, 227]. Sono stati identificati, inoltre, altri polimorfismi in grado di generare tre sequenze alleliche, quali ad esempio, TRQ, ARK, ALQ, i quali però sono molto rari nella popolazione ovina e quindi risulterebbe difficoltoso stabilire il ruolo che potrebbero avere nel determinismo della suscettibilità/resistenza nei confronti della malattia [1, 15, 47]. Alcuni studi statistici condotti su larga scala nella popolazione ovina hanno permesso di quantificare il rischio di sviluppare la malattia in associazione a ciascun genotipo mediante la sua misurazione indiretta come *Odds Ratio* (OR). In Gran Bretagna, il cosiddetto tasso di attacco ("attack rate"), utilizzato quale parametro di stima della suscettibilità/resistenza genetica, è risultato massimo per il genotipo VRQ/VRQ (545 casi per milione), seguito dai genotipi ARH/VRQ (405 casi per milione), ARQ/VRQ (225 casi per milione), ARQ/ARQ (37 casi per milione) e, infine, ARR/ARR (5 casi per milione) (114,31,224). È da notare, tuttavia, come nella popolazione ovina inglese i genotipi VRQ/VRQ, ARQ/VRQ e ARH/VRQ abbiano mostrato un "rischio d'infezione" da 20 (nel caso del genotipo VRQ/VRQ) a 50 volte superiore rispetto a quello di riferimento, mentre nella popolazione ovina italiana nessun genotipo ha mostrato un rischio d'infezione superiore a quello del genotipo ARQ/ARQ. Di contro, gli studiosi sono concordi sull'effetto protettivo dei genotipi ARR/ARR, ARR/ARH, AHQ/ARQ e, in generale, di quei genotipi contenenti l'allele ARR. Inoltre, la suscettibilità del genotipo ARQ/ARQ sembra essere massima in quelle razze ovine in cui non sia presente, o sia scarsamente rappresentato, l'allele VRQ (94), situazione che caratterizza alcune razze presenti nel bacino del mediterraneo, come la razza Sarda, per le quali i principali "target" genetici di Scrapie sono rappresentati dai genotipi ARQ/ARQ e ARQ/AHQ (458, 4). Ciò sembra dovuto non tanto all'elevata frequenza di questi genotipi nella popolazione ovina, quanto piuttosto ad una effettiva e più consistente suscettibilità degli stessi nei confronti dei ceppi di agente di Scrapie circolanti nel contesto geografico in esame [119].

Tabella 2. Classificazione delle configurazioni alleliche del gene PRNP, a livello dei codoni 136, 154, 171, in rapporto alla suscettibilità/resistenza nei confronti della Scrapie ovina secondo il National Scrapie Plan (NSP, UK, 2009).

Genotipo	Categoria di rischio	Suscettibilità/resistenza
ARR/ARR	1	Genotipo molto resistente
ARR/ARQ ARR/ARH ARR/ARQ	2	Genotipi resistenti
AHQ/AHQ AHQ/ARH AHQ/ARQ ARH/ARH ARH/ARQ ARQ/ARQ	3	Genotipi poco resistenti
ARR/VRQ	4	Genotipo suscettibile
AHQ/VRQ ARH/VRQ ARQ/VRQ VRQ/VRQ	5	Genotipi molto suscettibili

Classificare il rischio

In numerosi studi effettuati in merito alla modulazione della suscettibilità/resistenza alla Scrapie hanno portato il DEFRA (*Department for Environment Food & Rural Affairs*), nel 2001, ad elaborare una classificazione del rischio in base ai suddetti polimorfismi, suddividendo gli ovini in cinque categorie, indicate con la lettera R seguita da un numero progressivo. Secondo tale classificazione, la categoria di rischio più elevata – la R5 – viene riservata agli animali con genotipi VRQ/VRQ, VRQ/ARQ, VRQ/ARH e VRQ/AHQ. È opportuno specificare che il rischio per il genotipo VRQ/AHQ è sorprendentemente più basso, forse per un effetto “protettivo” attribuibile all’allele AHQ. Gli ovini inclusi nel gruppo R4 possiedono un genotipo VRQ/ARR e sono a minor rischio di sviluppare la malattia rispetto agli animali del gruppo R5. Gli ovini appartenenti al gruppo R3 posseggono un genotipo ARQ/ARQ o ARH/ARH; sono animali mediamente resistenti alla Scrapie, ma è necessario tenere in considerazione che ciò è strettamente legato alla razza in questione. Gli ovini del gruppo R2, rappresentato dai genotipi ARR/ARQ, ARR/AHQ e ARR/ARH, sarebbero abbastanza resistenti alla Scrapie, sebbene la loro progenie possa collocarsi in una categoria di rischio superiore. Infine, gli ovini appartenenti al gruppo R1, dotati di genotipo ARR/ARR sono considerati resistenti alla Scrapie classica naturale [169]. Ciononostante, è importante ricordare che la BSE è stata riprodotta sperimentalmente in animali recanti tale

Tabella 3. Frequenza dei polimorfismi del gene PRNP in ovini di razza Sarda, Comisana e Massese in diverse greggi italiane [4].

Alleli	% Riscontrabile nelle diverse razze		
	Sarda	Comisana	Massese
V136R154Q171	0	9,9	4,4
A136R154Q171	55,1	44,6	47,6
A136R154R171	39	41,4	45,9
A136H154Q171	4,5	4,1	1,7
A136R154H171	1,4	0,0	0,3
Numero ovini esaminati	485	111	147

genotipo [222] e, come già accennato, sono stati descritti rari casi di Scrapie in ovini dotati del genotipo resistente ARR/ARR, mentre è stato parimenti dimostrato l’effetto protettivo, nei confronti sia della Scrapie sperimentalmente indotta sia della Scrapie naturale, di alcuni polimorfismi del gene PRNP diversi rispetto a quelli presenti a livello dei codoni 136, 154, 171, con specifico riferimento all’allele AF141RQ e, in particolar modo, agli aplotipi AT137RQ e AI142RQ ARQK176 [296, 460]. È inoltre interessante notare che la maggior parte dei casi di Scrapie “atipica” insorgerebbero in animali di categoria R1-R3, e cioè proprio in quegli ovini che mostrano una ridotta sensibilità nei confronti della Scrapie “classica”. In effetti, i soggetti con genotipo AHQ/AHQ e AHQ/ARQ sono quelli in cui le forme atipiche di Scrapie tendono a prevalere, mentre l’allele AF141RQ conferirebbe maggior suscettibilità nei confronti della stessa rispetto all’allele AL141RQ [119]. Tale classificazione ha subito nel tempo diverse modifiche e revisioni sulla base delle nuove evidenze prodotte, in particolare per quei genotipi considerati meno frequenti nella popolazione ovina e per i quali erano a disposizione scarse informazioni (tabella 2). L’obiettivo era quello di ampliare la comprensione del ruolo svolto dai diversi genotipi nella suscettibilità/resistenza alle TSE, al fine di attuare adeguate misure di controllo nell’ambito del *National Scrapie Plan* (NSP). Tali misure si basano sull’attuazione di un piano di selezione genetica finalizzato al perseguimento dei seguenti obiettivi: eliminazione dell’allele VRQ dagli allevamenti aderenti al piano; incremento dell’allele ARR negli allevamenti aderenti al piano; aumento della disponibilità di montoni con genotipo ARR/ARR; progressiva diminuzione della frequenza dell’allele ARQ (DM 17/12/2004). Come già anticipato, l’effetto dei diversi polimorfismi del gene PRNP è variabile fra le diverse razze ovine. Nella razza *Chevoit*, per esempio, i soggetti omozigoti V136V e gli eterozigoti A136V sono suscettibili al *challenge* con il ceppo SSBP-1 della Scrapie, mentre gli omozigoti A136A risultano resistenti. Nella razza *Suffolk* la presenza dell’allele V136 è molto rara e i soggetti

Tabella 4. Consistenza numerica delle razze ovine in Italia.

Sarda	51.8
Comisana	13.1
Bergamasca	2.8
Bagnolese	2.0
Massese	1.5
Biellese	1.4
Appenninica	1.2
Laticauda	1.0
Valle del Belice	1.0
Gentile di Puglia	0.9
Leccese	0.8
Pinzirità	0.6
Bergschaf	0.4
Altamurana	0.2
Alpina tirolese	0.2
Barbaresca	0.2
Delle Langhe	0.2
Fabrianese	0.2
Garfagnana	0.2
Jura	0.2
Sambucana	0.2
Carsolina	0.1
Nero Bruna	0.1
Sopravissana	0.1
Ovini merinizzati	2.2
Ovini meticci	17.6
TOTALE	100

omozigoti Q171Q presentano la maggior suscettibilità nei confronti della malattia. Da questo punto di vista la razza Sarda si comporterebbe in modo analogo alla razza *Suffolk* [4, 167]. Nella razza Comisana sono stati identificati polimorfismi del gene *PRNP* in corrispondenza dei codoni 112, 136, 154 e 171 ed anche in questo caso è stata dimostrata una correlazione positiva tra il genotipo Q171Q e la suscettibilità alla Scrapie. È stata inoltre osservata sempre in questa razza, la presenza dell'allele V136, analogamente a quanto osservato nella razza Massese in cui il suddetto allele sarebbe presente in percentuale minore (tabella 3) [4].

Uno sguardo all'Italia

Il patrimonio zootecnico ovi-caprino conta in Italia attualmente circa 8,3 milioni di capi e in tale ambito la Sarda costituisce, tanto numericamente quanto economicamente, quella più

Tabella 5. Consistenza numerica del patrimonio ovi-caprino su base regionale; valori calcolati al 31 Gennaio 2016 sulla scorta dei censimenti effettuati o, in alternativa, mediante i registri di stalla (BDN dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto zooprofilattico sperimentale "G. Caporale" di Teramo).

REGIONI	OVINI	CAPRINI	TOTALE
Sardegna	3.103.473	297.925	3.404.375
Sicilia	882.971	139.628	1.029.000
Lazio	717.311	47.409	770.494
Toscana	409.528	24.738	435.795
Calabria	272.950	151.189	426.995
Puglia	266.677	69.072	335.816
Basilicata	257.448	63.062	323.997
Campania	213.068	50.095	264.869
Abruzzo	196.411	18.255	215.642
Lombardia	117.683	89.502	210.961
Piemonte	120.201	80.853	203.950
Marche	146.861	9.656	157.462
Umbria	113.774	7.045	121.152
Trentino A.A.	76.981	36.741	115.549
Veneto	73.139	22.340	96.170
Molise	76.524	10.005	86.407
Emilia Romagna	60.072	16.621	76.793
Friuli V.G.	21.604	7.287	28.885
Liguria	13.401	11.644	25.097
Valle d'Aosta	2.443	5.300	7.784
TOTALE	6.965.753	1.158.367	8.337.193

importante. La Regione con maggiore attività pastorizia è la Sardegna, che detiene il 41% del patrimonio ovino nazionale, seguita dalla Sicilia con circa il 12% e dal Lazio con il 10%. L'Abruzzo, pur potendo vantare un'antichissima tradizione pastorizia, attualmente si colloca solo all'ottavo posto tra le Regioni italiane, con 215.642 animali allevati.

È stata inoltre dimostrata, già da molto tempo, l'esistenza di ulteriori polimorfismi del gene *PRNP* a livello dei codoni 112, 127, 137, 138, 141, 143, 151, 176 e 211; tuttavia, le sostituzioni aminoacidiche a livello di tali codoni risultano meno frequenti e non sembrano influenzare in maniera determinante la suscettibilità e la resistenza nei confronti della Scrapie [4]. Più recentemente, i polimorfismi descritti a livello di altri codoni, con particolare riferimento alla presenza della metionina al posto della treonina o della leucina al posto della fenilalanina rispettivamente ai codoni 112 e 141, hanno mostrato di conferire una maggiore resistenza nei confronti della Scrapie [174, 263].

Per quanto concerne la specie caprina, i dati sulla suscetti-

bilità/resistenza alle TSE sono meno numerosi e consolidati rispetto a quelli disponibili per la specie ovina. I codoni 142 e 143 potrebbero modulare, in questa specie, la suscettibilità e la resistenza alla Scrapie, come dimostrato dai risultati ottenuti sia in seguito a prove sperimentali [168], sia in corso di infezione naturale [46]. Più in particolare, i polimorfismi N146S e N146D sarebbero associati ad una maggior resistenza nei confronti della Scrapie naturale [357]. Sono stati finora descritti vari polimorfismi nella specie caprina: I142M, H143R, Q222K e P240S. Polimorfismi silenti sono stati inoltre dimostrati a livello dei codoni 42, 138, 219 e 232 [2, 459]. In generale, 8 dei 29 polimorfismi del gene *PRNP* descritti nella capra hanno una distribuzione “cosmopolita” (P240, R143, S127, H154, K222, Q211, M142, S146) e almeno 5 di essi sarebbero in grado di modulare la suscettibilità dell’ospite nei confronti delle TSE [119, 459]. Nella specie bovina, al contrario, i polimorfismi del gene *PRNP* non risulterebbero correlati alla suscettibilità e/o alla resistenza nei confronti della BSE [169]. È importante però sottolineare, a questo proposito, che i polimorfismi che riguardano i codoni M112T e L141F sarebbero in grado, rispettivamente, di conferire maggior resistenza nei confronti della BSE in ovini britannici [405], aumentandone al contempo la suscettibilità nei confronti della Scrapie atipica [341]. 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 a carico del gene *PRNP*. A tal proposito, nel cervo mulo, i polimorfismi presenti a livello del codone 225, codificante per la serina o la fenilalanina, influenzerebbero la suscettibilità nei confronti della 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 d’incubazione è risultato ben più lungo. Polimorfismi addizionali ai codoni 95 (glutamina o istidina), 96 (glicina o serina) e 116 (alanina o glicina) sono stati altresì segnalati nel cervo dalla coda bianca (*Odocoileus virginianus*) [194, 245].

Il genotipo QGA è più frequente nei cervidi affetti da malattia rispetto al QSA [244, 354]. Il cervo delle Montagne Rocciose (*Cervus canadensis nelsoni*), invece, presenta una sequenza codificante che è polimorfica in corrispondenza del codone 132 (metionina o leucina) [352, 406]. A tal proposito, studi sperimentali [187, 355] indicano che i genotipi con gli alleli 132LL e 132ML sarebbero più resistenti nei confronti della CWD, mentre gli individui 132MM omozigoti sarebbero maggiormente suscettibili nei confronti della malattia [149]. Sebbene nessun genotipo sia in grado di fornire una resistenza completa, qualora il periodo d’incubazione e la patogenesi dell’infezione ne risultassero significativamente

influenzati, come avviene nella Scrapie ovina, ciò potrebbe avere importanti implicazioni ai fini dello sviluppo di strategie di gestione sanitaria e di controllo anche nei confronti della CWD [264].

Anche nel topo, la suscettibilità/resistenza nei confronti della Scrapie risultano influenzate in maniera determinante dal gene *PRNP*. Come già accennato in precedenza, infatti, in questa specie sono stati identificati due diversi alleli, *PRN-P-a* e *PRN-P-b*, in base ai polimorfismi presenti a livello dei codoni 108 e 189, associati rispettivamente ad una maggiore o minore suscettibilità alla Scrapie sperimentalmente indotta [337, 481]. Inoltre, grazie a una serie di approfonditi studi condotti sull’arvicola (*Myodes glareolus*), è stato dimostrato che quest’ultima specie risulterebbe essere molto sensibile nei confronti della Scrapie “classica”. Il gene *PRNP* dell’arvicola, infatti, presenta un sito polimorfico a livello del codone 109. I soggetti omozigoti M109M mostrano tempi d’incubazione più brevi rispetto ai soggetti eterozigoti M109I [5]. Un ulteriore studio effettuato in parallelo sul topo e sull’arvicola ha prodotto una serie di interessanti risultati. È stata riscontrata, infatti, una diversa suscettibilità nei confronti delle TSE fra l’arvicola e il topo, dal momento che la prima delle due succitate specie risulterebbe maggiormente sensibile alla Scrapie, mentre sarebbe resistente alla BSE. Tale situazione non sarebbe dissimile, in linea di massima, rispetto a quanto osservato nei corrispondenti modelli murini d’infezione sperimentale. È stato altresì rilevato che i polimorfismi a livello dei codoni 154 e 169 del gene *PRNP* sarebbero in grado di conferire una maggiore o una minore suscettibilità nei confronti dell’infezione, con successivo sviluppo di diversi fenotipi clinico-patologici in relazione ai differenti ceppi di agente prionico inoculati nelle arvicole oggetto di indagine [5].

Infine, per quanto concerne, le TSE umane, sono state descritte oltre 20 mutazioni puntiformi a livello del gene *PRNP*, alcune delle quali associate inevitabilmente alla comparsa di malattia e responsabili, pertanto, dello sviluppo di quelle forme ereditarie che colpiscono l’uomo quali fCJD, GSS e FFI [377].

È interessante notare, a tal proposito, che la vCJD ha colpito pressoché esclusivamente soggetti con genotipo M129M; pertanto anche in questi casi i polimorfismi del gene *PRNP* giocherebbero un ruolo determinante nel modulare la suscettibilità/resistenza dell’ospite nei confronti della malattia [160].

Per concludere, è utile sottolineare che, con ogni probabilità la suscettibilità/resistenza nei confronti delle malattie da prioni non può trovare spiegazione esclusivamente nell’esistenza di una serie di polimorfismi del gene *PRNP*, ma che goda piuttosto di una sufficiente base di plausibilità biologica l’ipotesi secondo cui il concorso di ulteriori fattori di natura genetica possa contribuire a modulare la suscettibilità/resistenza dell’ospite nei confronti delle TSE [119].

La Scrapie ovina: epidemiologia e modalità di trasmissione

La Scrapie ovina è una malattia neurodegenerativa cronica, a decorso inesorabilmente fatale che colpisce la pecora e la capra (segnalata anche nel muflone), conosciuta fin dal XVIII secolo e considerata unanimemente il “prototipo” delle TSE [119].

Scoperta per la prima volta in Inghilterra nel 1732, si è diffusa molto probabilmente da allevamenti di pecore *Merinos* della Spagna verso l'Europa centrale in seguito alla movimentazione di animali durante la fase preclinica dell'infezione. Attualmente la malattia ha assunto una diffusione cosmopolita, ma fanno eccezione l'Australia e la Nuova Zelanda che, pur possedendo all'interno della popolazione animali portatori di polimorfismi del gene *PRNP* in grado di conferire suscettibilità nei confronti della Scrapie, risultano ad oggi indenni dalla patologia [114]. La sua diffusione, unitamente alla continua evoluzione della sua distribuzione in ambito territoriale, hanno consentito di affermare che la Scrapie è una malattia infettiva contagiosa. In Italia è stata diagnosticata per la prima volta da Cravero nel 1976 in un gregge di pecore di razza Biellese della provincia di Cuneo [101] e per molti

anni la situazione epidemiologica relativa alla diffusione dell'infezione nelle diverse Regioni italiane è rimasta sconosciuta. L'incidenza regionale della malattia in Italia (dal 1995 al 2015), l'andamento della prevalenza della stessa e l'andamento temporale dei focolai di Scrapie ovi-caprina nel nostro Paese sono illustrati nelle figure 1-4.

Come avviene la diffusione?

Uno dei fattori che con ogni probabilità ha favorito l'enorme diffusione e la prolungata circolazione dell'agente patogeno nella popolazione ovina è il periodo d'incubazione insolitamente lungo che caratterizza la Scrapie. Esso è influenzato, come già esposto in precedenza, dal ceppo prionico responsabile e dal genotipo dell'ospite, che attraverso i vari polimorfismi del gene *PRNP* controllerebbe la dinamica della replicazione dell'agente. Unitamente al gene *PRNP*, altri fattori genetici dell'ospite potrebbero modificare la durata del periodo d'incubazione; è stato dimostrato, infatti, in un caso di Scrapie sperimentale murina, che esistono una serie di “*multiple quantitative trait loci*” situati all'interno dei cromosomi 2, 6, 7, 11 e 12 del topo [119].

Restano ancora da chiarire tuttavia, quali siano le fonti d'infezione nonché le vie di eliminazione dell'agente patogeno, al fine di comprenderne a fondo le modalità di diffusione. A questo proposito è stata documentata da tempo, in condizioni naturali, la trasmissione orizzontale, in cui l'infezione si realizza principalmente per via orale [145, 362, 364, 365].

L'apparato gastroenterico
L'apparato gastroenterico rappresenta uno dei principali siti di replicazione precoce dell'agente causale, che potrebbe pertanto essere escreto attraverso le feci [8, 114, 289, 397]. Gli studi effettuati negli ultimi anni, grazie anche all'ausilio della tecnica *Protein Misfolding Cyclic Amplification* (PMCA), mediante

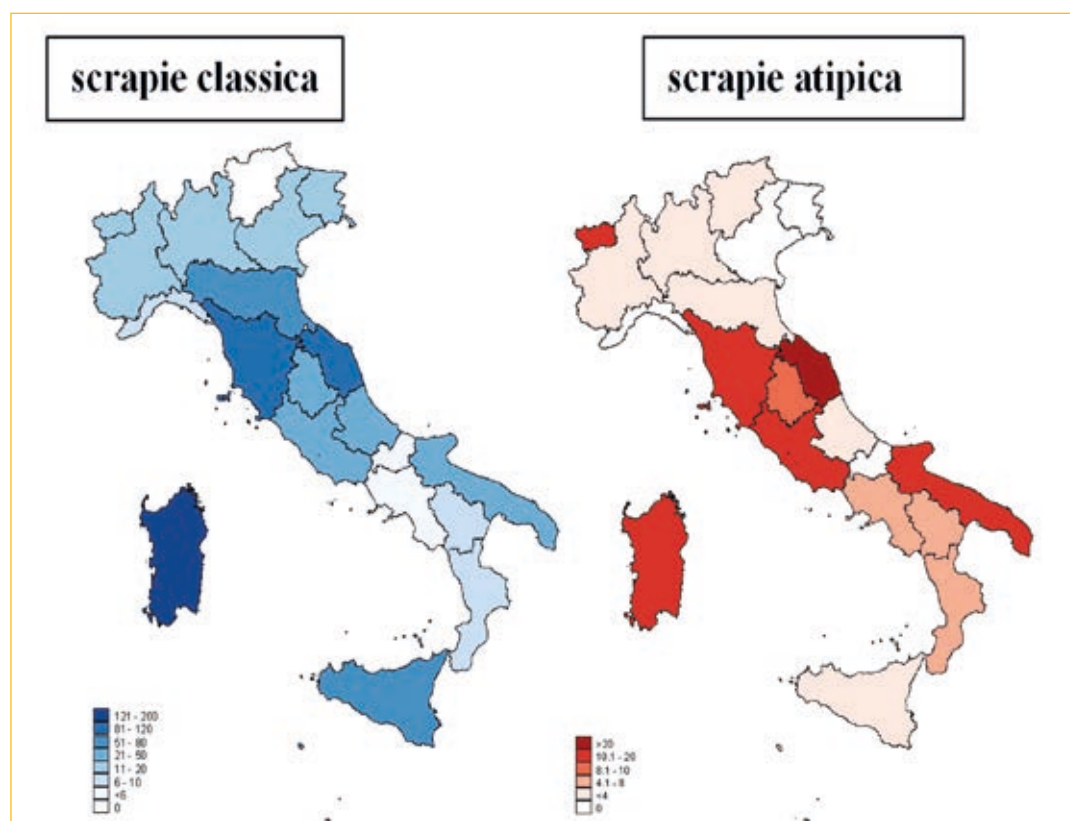


Figura 1. Incidenza regionale (numero di focolai/10.000 allevamenti) della Scrapie classica e della Scrapie atipica in Italia dal 1995 al 2015 (<http://www.izsto.it>).

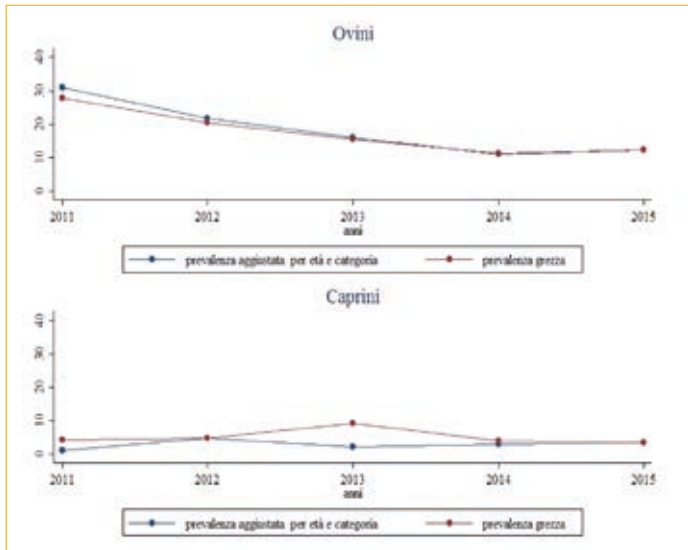


Figura 2. Scrapie classica: andamento della prevalenza (casi accertati/10.000 test rapidi effettuati) per specie osservata nell'ambito dell'attività di sorveglianza attiva negli anni 2010-2015 (a seguito di aggiustamento per età e categoria) (<http://www.izsto.it>).

la quale è stata accertata la presenza di PrP^{Sc} nelle feci di animali infetti, hanno confermato quest'ultimo dato [449]. È interessante notare, però, che mediante l'utilizzo di saggi biologici basati sull'impiego di roditori, nonché, di appropriati test immunologici, alcuni Autori hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} all'interno delle feci, sia durante il periodo di incubazione sia quando la malattia giungeva agli stadi terminali. In particolare, i saggi biologici hanno documentato alti livelli di infettività nelle feci di animali infettati per via orale, ma bassi livelli di infettività in seguito a infezione per via intracerebrale ed intraperitoneale. Questo dato potrebbe suggerire che, in seguito ad infezione per via orale, l'agente prionico potrebbe essere albergato ed essere escreto attraverso il tratto gastroenterico già durante la fase preclinica dell'infezione, oltre al fatto che la via di trasmissione condizionerebbe in maniera determinante la patogenesi dell'infezione stessa e, di conseguenza, la via di escrezione del prione [397].

Gli studi condotti negli anni passati avevano già consentito di ipotizzare che le ghiandole salivari potessero svolgere un ruolo nell'escrezione della Scrapie, anche se non era stata dimostrata la presenza della PrP^{Sc} nelle stesse o nella saliva [469]. Questi studi, infatti, avevano rivelato la sola presenza di un'attività trascrizionale del gene *PRNP*, con conseguente sintesi di PrP^C a livello delle ghiandole salivari [204].

Attualmente si ritiene che la saliva possa rappresentare un importante mezzo di diffusione dell'agente della Scrapie, sia grazie alla documentata presenza di infettività nella saliva di cervidi CWD-infetti [312], sia grazie alla dimostrata presenza di PrP^{Sc} nelle ghiandole salivari di ovini sperimentalmente infetti [204, 469]. In uno studio condotto successivamente, mediante l'ausilio della tecnica PMCA, è stata dimostrata

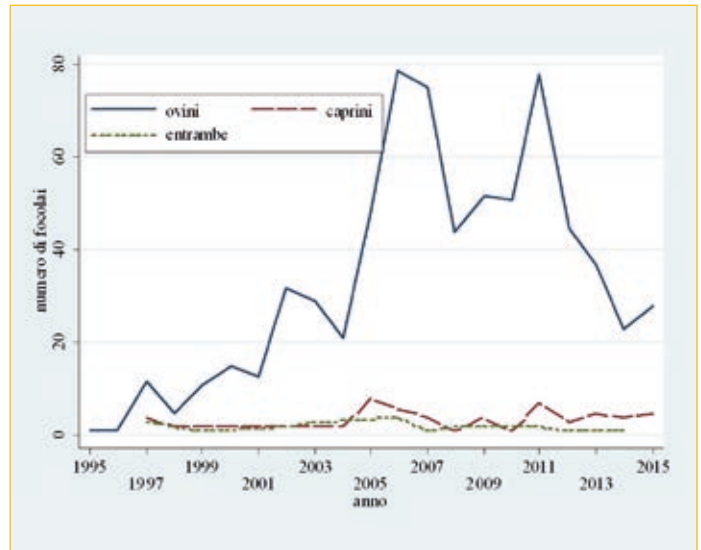


Figura 3. Trend temporale dei 789 focolai di Scrapie in Italia nel periodo 1995-2015, suddivisi per specie e per anno (senza distinzione tra forme classiche e forme atipiche) (<http://www.izsto.it>).

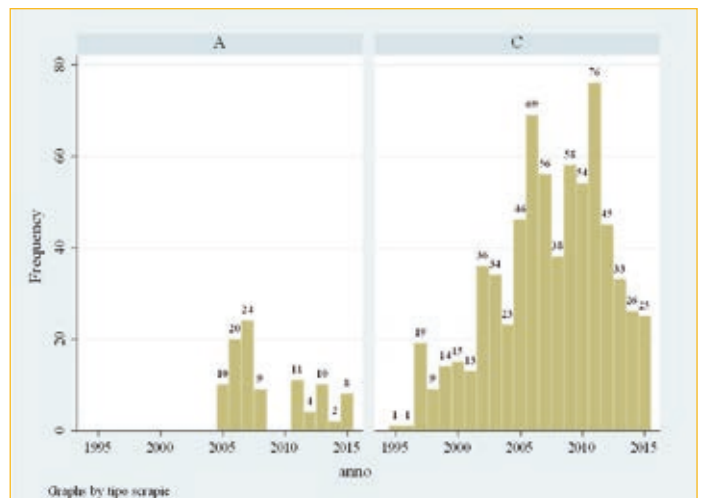


Figura 4. Trend temporale dei focolai, nel periodo 1995-2015, suddivisi per tipo di Scrapie (A=atipica; C=classica) (<http://www.izsto.it>).

la presenza di PrP^{Sc} in secreti della cavità buccale di pecore affette da Scrapie [294].

La placenta

È oramai opinione comune che la placenta di animali infetti rappresenti la più importante fonte di infezione, nonché di contaminazione ambientale. Nel lontano 1974 Pattison già aveva dimostrato, infatti, che somministrando placente provenienti da pecore infette ad altri soggetti sani, questi ultimi sviluppavano la malattia [365]. Successivamente, Onodera (1993), pur non avendo rilevato mediante WB la presenza

diPrP^{Sc} nella placenta di due pecore affette da Scrapie, osservò che inoculando materiale placentare proveniente da tali soggetti in topini da laboratorio, questi manifestavano sintomi neurologici riferibili appunto alla Scrapie, confermando così l'infettività di tale distretto. Si comprese, quindi, che il parto potesse rappresentare un momento cruciale ai fini della trasmissione orizzontale dell'infezione, proprio a causa del ruolo chiave svolto dalla placenta, la quale può veicolare notevoli quantità di PrP^{Sc} anche in animali asintomatici, determinando al contempo la contaminazione diretta dell'ambiente circostante [18, 383, 454, 455].

Le cellule trofoblastiche multinucleate molto probabilmente svolgono un ruolo chiave nel mantenimento della PrP^{Sc} a livello placentare [260]. È stato altresì dimostrato che la placenta di un animale infetto può albergare o meno PrP^{Sc} anche in corso di successive gestazioni e ciò sarebbe in diretta relazione con il genotipo del feto [383]. In particolare, è stato osservato che pecore portatrici di feti con genotipo Q171R sono risultate resistenti all'accumulo placentare di PrP^{Sc} [454], mentre pecore affette da Scrapie e gestanti feti con genotipo ARQ/ARQ sarebbero in grado di accumulare PrP^{Sc} a livello placentare ed animali con feti dotati di genotipo ARQN(176)/ARQK(176) o ARQ/ARR non sarebbero in grado di albergare PrP^{Sc} a livello placentare. Inoltre, gli stessi Autori hanno suggerito che anche i polimorfismi presenti a livello del codone 141 possano influenzare la deposizione placentare di PrP^{Sc}. Infatti, è stato osservato che in feti ovini portatori di polimorfismi del gene *PRNP* diversi da quelli presenti a livello del codone 171, si può avere un mancato accumulo placentare di PrP^{Sc} [454]. Anche nella capra (*Capra hircus*) in corso di Scrapie naturale la placenta albergherebbe notevoli quantità di PrP^{Sc} [356]. È stato anche ipotizzato che l'agnello possa contrarre l'infezione durante il puerperio. La trasmissione nella fase puerperale è stata suggerita dall'osservazione che agnelli nati da pecore gravide infette sviluppavano la malattia molto precocemente rispetto agli altri [116].

La trasmissione verticale

Per quanto concerne la trasmissione verticale dell'infezione, i dati sono piuttosto scarsi. Foster (1992), mediante il trasferimento di embrioni di 5–6 giorni d'età da pecore affette da Scrapie a pecore sane, aveva osservato la malattia in 6 agnelli su 20, affermando quindi che la trasmissione dalla madre alla prole potesse avvenire precocemente.

Al contrario, in uno studio simile, [139], non vennero riscontrati casi di Scrapie in discendenti ottenuti trasferendo embrioni da pecore donatrici infette a riceventi sane. Successivamente, in ulteriori studi [144, 147] d'infezione sperimentale su capre e pecore con l'agente della BSE, non si osservò alcun caso di trasmissione dell'infezione per via verticale. Studi su agnelli nati da madri affette da Scrapie e da madri sane hanno messo in evidenza che non esisterebbe in realtà alcuna differenza nei confronti del rischio di contrarre l'infezione. Infatti, le prime

positività alla PrP^{Sc} negli agnelli sono state osservate a partire da 20 giorni d'età in entrambi i casi, a livello delle placche del Peyer, a supporto del fatto che l'infezione non si realizzerebbe per via verticale, ma nel periodo perinatale [18]. In un altro importante studio, Garza *et al.* [157] hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nel liquido amniotico e in alcuni tessuti fetali di ovini affetti da Scrapie naturale a dimostrazione della possibilità di trasmissione verticale dell'infezione.

In un recente studio del 2013, infine, infettando sperimentalmente pecore gravide di razza *Cheviot* con genotipo VRQ/VRQ e VRQ/ARQ (in cui la Scrapie naturale era endemica) con il ceppo SSBP/1 di Scrapie, è stato osservato che la trasmissione prenatale dell'infezione sarebbe possibile nella pecora. In particolare, lo scopo era quello di studiare la trasmissione verticale della Scrapie sperimentale utilizzando tecniche di *embryo-transfer*, in modo da trasferire gli embrioni in madri surrogate recanti sia genotipi sensibili che resistenti, fornendo quindi preziose informazioni anche sulla suscettibilità nei confronti della malattia. I segni clinici della malattia sono comparsi nella prole, ma la prova dell'infezione da SSBP/1 è stata trovata solamente negli agnelli nati da madri con genotipo *PRNP* completamente sensibile [148]. Se la trasmissione verticale della Scrapie è possibile, resta da chiarire con quali meccanismi questa possa avvenire. La morfologia placentare della pecora, infatti, rende difficile la comprensione dei meccanismi attraverso i quali l'infezione potrebbe trasmettersi al feto in utero.

Gli studi che in passato hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nei tessuti placentari ovini [16, 18, 454] implicano che ci debba essere una qualche comunicazione tra madre e feto che possa spiegare la trasmissione dell'agente causale. A tal proposito, molto interessanti appaiono quelle zone all'interno dei placentomi in cui l'epitelio dei villi coriali ed i tessuti materni appaiono giustapposti. In queste zone, definite ematomati, le cellule del trofoblasto sono coinvolte in processi di fagocitosi di macromolecole e soprattutto di eritrociti [70, 403]. Il sangue materno che fuoriesce dai capillari e da altri vasi sanguigni maggiori [70] si accumulerebbe nell'interfaccia materno-fetale a livello dell'arcata, andando a costituire la zona dell'ematofago. Qui, oltre agli eritrociti, le cellule del trofoblasto fagocitano anche leucociti materni, cellule epiteliali ed altre cellule circostanti [343]. In linea teorica, questa zona potrebbe anche consentire il passaggio dell'infezione dalla madre al feto, considerando che il sangue di animali con Scrapie in fase preclinica di malattia presenterebbe alti livelli d'infettività [223].

Una fonte alternativa di infezione in utero potrebbe essere, come già detto, il liquido amniotico che pur non presentando alti livelli di PrP^{Sc} potrebbe veicolare l'infezione dalla madre al feto durante la fase di deglutizione fetale che avviene nell'ultimo terzo di gravidanza. È stato dimostrato, infatti, che feti ovini nell'ultimo terzo della gestazione, possono deglutire 20–200 ml di liquido amniotico in 2–7 occasioni consecutive

al giorno [54]; questa ipotesi sembra andare d'accordo con l'osservazione che la PrP^{Sc} sarebbe presente molto precocemente all'interno delle placche del Peyer, così come in altri distretti del tratto gastro-enterico di agnelli neonati [18].

La via respiratoria

La via inalatoria può altresì costituire un'ulteriore modalità di acquisizione dell'infezione. Numerosi studi, infatti, documentano l'accumulo di PrP^{Sc} a livello della mucosa nasale [93], consentendo di ipotizzare che l'infezione si possa trasmettere per via aerogena [191, 188]. Tuttavia, anche se ad oggi i meccanismi di diffusione dei prioni per via respiratoria non risulterebbero totalmente compresi, un recente studio sperimentale del 2016 effettuato nella specie murina ha potuto dare conferme a quelle che negli anni precedenti erano solo ipotesi. In questo studio sono stati utilizzati topi *wild type* e transgenici privi di linfociti B e T, cellule NK, fattori del complemento e FDCs nonché topi Tga20, sovraespressanti la PrP^C. L'infezione di questi animali attraverso aerosol si è dimostrata efficace, coinvolgendo le vie nervose direttamente, senza cioè una precedente fase di replicazione negli organi linfoidi. Pertanto, un sistema immunitario funzionalmente intatto non sarebbe strettamente necessario per l'infezione aerogena da prioni [192].

Ancora più interessanti sono, in tale ambito, una serie di ulteriori studi che hanno dimostrato la presenza di PrP^{Sc} in distretti che normalmente non costituiscono sedi di accumulo della proteina prionica patologica, quali il rene, la mammella e il polmone di ovini con Scrapie o affetti contemporaneamente da Scrapie e Visna-Maedi [192, 280, 430, 431, 401]. L'attenzione degli studiosi sopra citati si è concentrata in particolar modo sul ruolo svolto dall'urina e dai secreti mammari (colostro e latte) nell'epidemiologia dell'infezione. La concomitanza delle cosiddette patologie poli-infiammatorie con la presenza di Scrapie e la persistenza/resistenza dei prioni nell'ambiente esterno, rappresentano in tale contesto due punti fondamentali che vale la pena approfondire. Le malattie infiammatorie, e in particolar modo alcune di quelle a decorso cronico, allorché concomitanti con la presenza di Scrapie, possono agire come "modificatori" e amplificatori di trasmissione, espandendo la distribuzione tissutale dei prioni.

L'urina

Uno studio condotto nel 2005 mediante l'utilizzo di modelli murini transgenici, aveva già anticipato questo dato e dimostrando, in particolare, che le infiammazioni linfocitarie croniche possono svolgere un importante ruolo nella diffusione dei prioni, modificandone le vie naturali di eliminazione [145, 201].

Questo dato è stato successivamente confermato nell'infezione naturale grazie agli studi condotti da Ligios *et al.* (2005).

L'individuazione della PrP^{Sc} all'interno delle urine è stata inequivocabilmente dimostrata mediante l'utilizzo di saggi

biologici effettuati su topi transgenici. Nel 2005, infatti, è stata dimostrata la presenza del prione all'interno delle urine di topi durante gli stadi preclinici e clinici di Scrapie e, soprattutto quando gli stessi animali erano contemporaneamente affetti da nefrite linfocitaria, oltre ad aver documentato la presenza di infettività nelle urine ("prionuria"), gli stessi studiosi hanno anche concluso che la malattia infiammatoria del rene in soggetti Scrapie-infetti può aumentare l'eliminazione di PrP^{Sc} attraverso le urine [415]. Questi dati sono stati successivamente supportati da un altro studio sperimentale che, mediante l'utilizzo della PMCA, ha riportato la prima dimostrazione biochimica di PrP^{Sc} nelle urine di *hamster* affetti da Scrapie in fase terminale. In questo caso, la PrP^{Sc} è stata rilevata in una frazione di urine raccolte mediante filtrazione, cosa che potrebbe indicare che la stessa PrP^{Sc} possa essere associata a cellule come leucociti o cellule epiteliali dei tubuli renali. È importante sottolineare che questo studio ha anche dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nelle urine di animali senza malattie infiammatorie del rene indicando, che ciò sarebbe un prerequisito indispensabile per l'escrezione dell'agente prionico [342]. Successive indagini hanno dimostrato la presenza di infettività nelle urine di criceti Scrapie-infetti che non presentavano alcun tipo di infiammazione a carico dell'organo escretore, nonché all'interno della vescica urinaria e del parenchima renale [170, 181].

I secreti mammari

La potenziale infettività dei secreti mammari è stata oggetto di dibattito per molti anni all'interno della Comunità Scientifica e i risultati ottenuti in passato, basati sia su saggi biologici che su dati epidemiologici, indicavano chiaramente che colostro e latte non potessero rappresentare mezzi importanti di diffusione delle TSE [363, 484]. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato in modo esplicito la presenza di prioni nel latte di ovini Scrapie-infetti. I primi dati sul ruolo potenziale di latte e colostro nell'epidemiologia dell'infezione si basano, come già precedentemente esposto, sul riscontro di PrP^{Sc} all'interno della ghiandola mammaria di pecore infettate con l'agente della Scrapie e affette contemporaneamente da mastiti a carattere linfoproliferativo [192]. Studi successivi hanno evidenziato la presenza di infettività nel latte utilizzato per l'alimentazione di agnelli non affetti da Scrapie nati da madri Scrapie-infette, dimostrando chiaramente che i secreti mammari costituirebbero un'importante fonte di eliminazione dell'agente prionico con conseguente accumulo della stessa PrP^{Sc} all'interno del sistema linforeticolare (LRS) degli agnelli [251]. In seguito, la presenza di infettività è stata dimostrata nel latte di ovini affetti da mastiti a carattere linfoproliferativo con conseguente formazione di follicoli linfatici ectopici come conseguenza dell'infezione da virus della Maedi-Visna. In particolare, è stata documentata la presenza di infettività nel latte di ovini fino a 20 mesi prima delle manifestazioni cliniche di malattia, con specifico riferimento ad animali appartenenti sia al genotipo

VRQ/VRQ sia al genotipo ARQ/VRQ. Mediante l'utilizzo di prove biologiche condotte su topi transgenici, è stata altresì dimostrata la presenza di infettività nel colostro e nel latte provenienti da animali non affetti da mastiti croniche linfoproliferative, indicando che tali lesioni infiammatorie della ghiandola mammaria non rappresenterebbero un pre-requisito necessario ai fini dell'escrezione prionica; infine, la comprovata presenza di PrP^{Sc} in tutte le componenti del latte analizzato (frazioni cellulari, crema, caseina del siero) pone una serie di importanti interrogativi in merito al rischio di trasmissione all'uomo di agenti prionici a seguito del consumo di prodotti lattiero-caseari ovini nonché di altre specie animali, oltre che in merito al rischio per gli stessi animali, sia direttamente, sia attraverso la presenza di derivati del latte nei mangimi [261, 280]. Un altro studio del 2009, basato sull'impiego della tecnica PMCA, ha altresì dimostrato la presenza di PrP^{Sc} nel latte di ovini infetti sia durante le fasi pre-clinica e clinica [293]. I meccanismi attraverso i quali i prioni possono essere escreti attraverso il latte risultano essere, tuttavia, ancora poco chiari. Una delle ipotesi al riguardo sostiene che la PrP^{Sc} possa essere trasportata mediante processi di esocitosi da parte delle cellule epiteliali, oppure attraverso la secrezione da parte di ghiandole apocrine deputate alla produzione di globuli di grasso [117]. È stato altresì ipotizzato che l'agente prionico possa raggiungere la ghiandola mammaria attraverso la via ematogena. È noto infatti che la PrP^{Sc}, durante la diffusione nella circolazione ematica [226, 448], risulta associata ad alcune componenti del sangue che verrebbero poi escrete nel colostro e nel latte, tra cui i macrofagi CD68+. Queste cellule si localizzerebbero all'interno della ghiandola mammaria in concomitanza con la presenza di PrP^{Sc} e di contestuali lesioni mastitiche. Ciò darebbe valore all'ipotesi che le patologie infiammatorie della mammella possano in qualche modo amplificare l'eliminazione dell'agente prionico attraverso i secreti mammari. Tuttavia è stato anche osservato che la mancata presenza di cellule CD68+ all'interno del tessuto mammario non precluderebbe l'escrezione dei prioni attraverso il latte, indicando che oltre alla via ematogena possano esistere molteplici e differenti vie di eliminazione dei prioni mediante i secreti mammari [261].

Il sangue

La presenza di infettività è stata dimostrata anche nel sangue di un certo numero di specie animali infettate sperimentalmente o naturalmente tra cui roditori [57, 61], cervidi [312], pecore [221], capre [104] e primati non umani [51]. È importante sottolineare, a questo proposito, che nel caso della vCJD umana sono stati riportati 4 casi di trasmissione dell'infezione in soggetti che avevano ricevuto trasfusioni di sangue da donatori asintomatici. Ciò supporta grandemente l'ipotesi che il sangue possa rappresentare un ulteriore mezzo di diffusione dell'infettività prionica [281, 366, 490]. Più di recente, saggi biologici effettuati mediante l'utilizzo di topi transgenici, hanno rivelato la presenza di infettività in alcuni campioni di plasma di persone

affette da sCJD e vCJD [125]. Anche se i titoli infettanti nel sangue sarebbero molto bassi rispetto a quelli presenti in altri tessuti, la documentata trasmissione dell'infezione a seguito dell'inoculazione di appena qualche centinaio di microlitri di sangue intero Scrapie-infetto per via intracerebrale (IC) a topi sensibili, indicherebbe che la trasmissione dell'infezione mediante trasfusioni possa essere molto più efficiente rispetto a quanto ritenuto in passato [20]. La distribuzione dell'infettività tra i componenti del sangue può sostanzialmente variare da specie a specie e da prione a prione. In effetti, mentre gli studi precedenti effettuati su roditori [61], primati [51], cervidi [313] e pecore [223] avevano chiaramente dimostrato che almeno parte dell'infettività fosse associata ai globuli bianchi (WBC), attualmente è stata rilevata infettività anche nelle piastrine di topi vCJD-infetti [82], cervi CWD-infetti [313], pecore Scrapie-infette [262] e BSE-infette [321]. Il rilevamento d'infettività prionica, sensibile e specifico a livello del sangue rappresenta un fondamentale prerequisito al fine di progettare nuovi test di diagnosi precoce e non invasiva, nonché per migliorare la sicurezza nelle procedure di trasfusione di sangue e degli emoderivati, oltre che per studiare la "prionemia specie/agente-dipendente" nell'uomo e negli animali [186].

La via iatrogena

Un'altra importante via di trasmissione degli agenti delle TSE è stata identificata in quella iatrogena, in passato ritenuta responsabile di gravi epidemie. Un primo episodio di questa natura si verificò, infatti, negli anni '40 nel Regno Unito in seguito alla somministrazione di un vaccino inattivato nei confronti della *Louping Ill* contaminato dal prione della Scrapie [175]. Più recentemente, l'impiego di un vaccino nei confronti di *Mycoplasma agalactiae* è stato messo in relazione con l'insorgenza di numerosi focolai di Scrapie ovina e caprina in Italia [4].

Non è nota, al momento, l'esistenza di portatori (*carriers*) asintomatici, ovvero di soggetti che siano in grado di diffondere efficacemente il prione della Scrapie, senza che l'infezione si trasformi in malattia clinicamente manifesta. L'eventuale esistenza di *carriers* avrebbe delle ripercussioni epidemiologiche molto rilevanti e rimetterebbe in discussione l'efficacia dei piani di selezione genetica attualmente utilizzati nel controllo della Scrapie [114].

La persistenza/resistenza

Un altro fondamentale aspetto riguardante l'epidemiologia delle TSE è quello legato alla persistenza/resistenza dell'agente infettivo nell'ambiente esterno. Un primo esperimento in tale contesto fu effettuato da Grieg (1940), il quale osservò che, pecore sane stabulate in un ovile chiuso che aveva precedentemente ospitato animali Scrapie-infetti, svilupparono la malattia in assenza di alcun tipo di contatto tra animale e animale [182].

Gli studi di Pattison e Jones risalenti alla fine degli anni '60, avevano consentito di ipotizzare che l'infettività potesse protrarsi nel tempo [361]. Solamente nel 1991, però, furono effettuati i primi studi sperimentali il cui obiettivo era quello di valutare l'infettività residua in campioni di suolo in cui era stato interrato per oltre 3 anni l'encefalo di un ovino affetto da Scrapie [60].

Molti anni più tardi in una piccola fattoria dell'Islanda, precedentemente colpita da Scrapie, fu dimostrata con pressoché assoluta certezza la persistenza nell'ambiente per almeno 16 anni [159].

I primi lavori sistematici in tale contesto mettevano in evidenza come la PrP^{Sc} possa interagire con terreni agricoli differenti per caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche, una volta che gli stessi siano stati messi a contatto con campioni di tessuto cerebrale ottenuti da ovini Scrapie-infetti [270]. Altri studi effettuati all'incirca nello stesso periodo hanno voluto approfondire le conoscenze sulle proprietà fisico-chimiche dei terreni che potrebbero essere all'origine della persistenza dei prioni nel suolo. E così, analizzando approfonditamente minerali quali montmarillonite, caolinite e quarzo, si è compreso che l'assorbimento della PrP^{Sc} dipende anche dalle proprietà di superficie dei materiali.

Oltre ai suddetti materiali, risulta estremamente importante il comportamento delle argille nel veicolare l'infettività [388]. A tal proposito, ad oggi, la presenza di infettività nei vari materiali può essere svelata sia utilizzando appositi saggi *in vitro*, quale ad esempio la *Standard Scrapie Cell Assay* (SSCA) [158], sia saggi biologici (*Syrian hamster*), anche se i primi si sono rivelati i metodi più semplici e affidabili.

In seguito, grazie all'ausilio di lisimetri, è stato dimostrato che la PrP^{Sc} può persistere nel terreno per oltre 21 mesi, comprovando con questo che la diffusione dei prioni può avvenire anche attraverso le acque reflue [417].

Studi più recenti hanno inoltre documentato che l'esposizione di pecore a un ambiente contaminato durante il parto è sufficiente a causare la malattia e che i pascoli possono mantenere l'infettività per almeno 36 giorni dopo l'allontanamento degli animali infetti [115].

Successivamente è stata presa in considerazione, da parte di alcuni Ricercatori, la possibilità che l'infettività potesse essere veicolata non solo dal suolo, bensì dai cosiddetti "fomites", vale a dire quegli oggetti e materiali, utilizzati routinariamente all'interno degli allevamenti, che possono fungere da veicolo dell'infezione.

Un apposito studio ha dimostrato, in proposito che l'infettività prionica possa essere veicolata da recinzioni metalliche o in legno, così come da oggetti in plastica [294]. A conferma di ciò, uno studio del 2015, *in vivo*, ha dimostrato come, diverse superfici presenti all'interno degli allevamenti (abbeveratoi, recinzioni, mangiatoie, etc), utilizzate da pecore Scrapie-infette 8 settimane prima e in cui era stata dimostrata la presenza di PrP^{Sc} mediante la tecnica PMCA, sono state in grado di

trasmettere l'infezione ad agnelli sani e recanti genotipo VRQ/VRQ [253]. Un recentissimo studio ha dimostrato infine, sempre mediante la tecnica PMCA, la presenza di PrP^{Sc} all'interno di polveri di comune riscontro in un allevamento affetto da Scrapie [177].

La presenza di infettività, oltre che nel suolo e nelle varie superfici degli allevamenti, nonché nel particolato aerodisperso, illustra le difficoltà che possono essere associate con la decontaminazione efficace delle suddette aree colpite e, in definitiva con il controllo dell'infezione.

L'epidemiologia e le modalità di trasmissione della Scrapie "atipica" sostenuta dai ceppi *Nor98* e *Nor98-like* risultano nettamente diverse rispetto a quanto si è detto per la Scrapie classica.

A partire dal 1998, casi di Scrapie "atipica" sono stati identificati in Europa (compresa l'Italia), principalmente attraverso la sorveglianza attiva su ovini asintomatici [72, 107, 344, 351, 372]. Si tratta di una forma nettamente distinta sotto il profilo biochimico, neuropatologico ed epidemiologico rispetto alla Scrapie "classica". In effetti, la PrP^{Sc} della Scrapie "atipica" risulta essere meno resistente alla proteinasi K rispetto alla omologa PrP^{Sc} della Scrapie "classica", presentando altresì un *pattern* più variabile in *Western blotting*, compresa una caratteristica banda a basso peso molecolare (7-12kDa), non presente nella forma classica [267].

Inoltre la Scrapie "atipica" tende a verificarsi in animali più anziani e negli ovini con genotipo AHQ e ARR, considerati resistenti alla Scrapie "classica" [40]. Tuttavia, esiste una certa sovrapposizione tra le due forme rispetto alla suscettibilità dell'ospite; in alcuni genotipi, quali ad esempio VRQ/AL141RQ e AL141RQ/AL141RQ, possono coesistere sia casi di Scrapie "classica" che "atipica" [133]. Un altro studio condotto al riguardo, ha confermato, infatti, che entrambe le forme possono coesistere in uno stesso animale dotato di genotipo AL141RQ/AF141RQ [315].

Ad oggi si pensa che la Scrapie "atipica" non possa essere trasmessa in condizioni naturali; è quindi opinione comune che essa possa rappresentare una forma spontanea, "sporadica" e "non contagiosa" di Scrapie [40]; tuttavia, è stata anche dimostrata con successo la trasmissione sperimentale dell'infezione in ovini e in topi transgenici. I primi, in particolare, presentavano un quadro sintomatologico simile a quello osservato nelle infezioni originarie degli ovini [19, 267, 426, 427].

Infine, in uno studio del 2015 alcuni Ricercatori, facendo ricorso ai campioni presenti in un archivio di materiale biologico proveniente da ovini sia sani che affetti da Scrapie, hanno identificato tre casi di Scrapie "atipica", tra cui una pecora, morta nel 1972; due ulteriori casi, mostravano altresì evidenze di infezione mista con Scrapie "classica"/Scrapie "atipica". I due succitati casi indicherebbero che le infezioni associate possano esser presenti da molto tempo, contribuendo altresì ad aumentare la variabilità dei ceppi di Scrapie [86].

La Scrapie ovina: caratteristiche cliniche e neuropatologiche

La Scrapie ovina non compare, di regola, in animali di età inferiore a 2 anni, manifestandosi in genere a 3-4 anni di vita a causa del lungo stadio prodromico, che varia da parecchi mesi fino a 4-5 anni. Il periodo di incubazione della malattia è influenzato, al pari del suo fenotipo clinico-patologico, dal ceppo prionico responsabile e dal genotipo dell'ospite [119]. A causa dell'influenza esercitata dalle suddette variabili, la malattia ha assunto manifestazioni cliniche differenti da territorio a territorio. La prova di ciò risiede nel fatto che in alcuni Paesi la malattia, che può avere una durata anche di più mesi, è stata indicata con nomi diversi, a seconda della manifestazione clinica più frequentemente osservata: *Scrapie* (grattamento, prurito), come la malattia è comunemente nota; *rida* (atassia) in Islanda; *tremblante* (tremore) in Francia; *traberkrankheit* (malattia del trotto) in Germania.

Al pari di tutte le altre TSE, la sintomatologia della Scrapie ha carattere progressivo con durata variabile da poche settimane ad alcuni mesi, culminando inevitabilmente con il decesso dell'animale, che si manifesta in genere a partire da circa un paio di settimane a 6 mesi dalla comparsa dei segni clinici. La Scrapie decorre costantemente in assenza di febbre [103, 119]. Le prime manifestazioni cliniche consistono generalmente in disturbi comportamentali, quali ipereccitabilità o – a seconda dei casi – stato stuporoso (cosiddetto *star gazing* degli autori anglosassoni) e depressione del sensorio. Fanno seguito, in lenta progressione, tremori muscolari, atassia locomotoria, cecità (come conseguenza dell'accumulo di PrP^{Sc} anche a livello della retina) [215], paralisi flaccida o spastica del treno posteriore, digrignamento dei denti, dimagrimento (non sempre presente), crisi ipotoniche, aggressività, scialorrea, disfagia, e rigurgito alimentare, segno clinico, quest'ultimo, riscontrato più frequentemente nella specie caprina. La figura 6 riporta la frequenza dei più comuni sintomi clinici osservati in corso di Scrapie ovina [103].

Per quanto attiene al sintomo ritenuto predominante, ossia il prurito, seppur non patognomonica, tale manifestazione si verifica spesso a carico dei fianchi con conseguente perdita del vello e comparsa di abrasioni cutanee più o meno gravi ed estese, conseguenti al continuo sfornamento del corpo contro oggetti fissi. In alcuni individui, inoltre, il grattamento può stimolare un riflesso (*nibble reflex*) che consiste in un caratteristico sbattimento e retrazione delle labbra, associato a protrusione della lingua quando viene grattato il dorso dell'animale o quando si applica uno stimolo pressorio alla base della coda [119].

Da quanto finora esposto appare chiaro che la Scrapie ovina può presentare un'ampia gamma di caratteristiche cliniche e patologiche e soprattutto che le variazioni del fenotipo patologico di volta in volta riscontrato sono attribuibili principalmente a differenze genotipiche esistenti tra gli animali

colpiti, nonché al ceppo di agente responsabile dell'infezione. L'influenza di questi fattori sulle caratteristiche cliniche della malattia è stata ampiamente studiata nel corso degli anni; per tale motivo è utile comparare i risultati di alcuni studi finalizzati alla valutazione, in termini di frequenza, dei principali segni clinici rilevati in corso di Scrapie. Alcuni autori [89, 258] hanno confermato che in corso di Scrapie le manifestazioni cliniche considerate "classiche" non sono affatto costanti. Infatti, in un gregge di animali in cui erano presenti sia soggetti sani sia malati, alcuni segni clinici quali perdita di peso e lesioni cutanee non erano costantemente presenti tra gli ovini affetti da Scrapie [258]. Per quanto riguarda i segni clinici meno frequenti, alcuni studi descrivono al riguardo, una condizione di iper-reattività al suono (battito di mani) negli animali affetti da Scrapie, variabile tra il 29,4% e il 50% [193, 468]. Anche per quanto concerne il "*nibble reflex*", i dati presenti in letteratura risultano essere alquanto discordanti. In alcuni casi, infatti, il succitato riflesso è stato riscontrato nel 49% degli animali affetti da Scrapie [468], mentre lo stesso risultava maggiormente rappresentato in altri studi [193].

Uno studio condotto in senso retrospettivo nelle isole Shetland su un numero elevato di casi sospetti, confermati e non – 772 animali sospetti esaminati di cui 574 positivi e 198 negativi – ha fornito preziose informazioni consentendo di porre in relazione il segno clinico con l'effettiva presenza di malattia. I segni clinici più attendibili ai fini della diagnosi clinica si sono rivelati il prurito, la perdita di lana, l'iperestesia, l'atassia e il dimagrimento [89].

Nel 2012 alcuni Autori, infettando sperimentalmente 65 animali appartenenti a due diverse razze (Suffolk e Cheviot) e a 4 differenti genotipi attraverso due differenti vie di trasmissione (orale e sottocutanea) hanno ottenuto importanti risultati soprattutto nella correlazione esistente tra la suscettibilità alla Scrapie e il fenotipo clinico-patologico. I dettagli relativi alla frequenza e gravità dei segni clinici rilevati in questo studio sono stati i seguenti: l'atassia era il segno clinico predominante, presentandosi nell'89% delle pecore interessate, la perdita di peso è stato il meno comune dei segni clinici essendo presente solo nel 24% dei casi. La disfagia era presente nel 37% degli animali colpiti e il prurito mediamente nel 47% delle pecore, mentre i cambiamenti comportamentali nel 58%. La gravità degli ultimi tre segni clinici (disfagia, prurito e cambiamenti comportamentali) era moderata quando presente, mentre l'atassia costituiva il segno clinico più evidente. I risultati di questo studio suggeriscono, a loro volta, che il fenotipo clinico di Scrapie ovina rappresenti il risultato della complessa interazione tra diversi fattori, quali sorgente d'infezione, nonché animali donatori e destinatari della medesima [174].

Una valutazione clinica dettagliata è stata altresì eseguita su 162 casi di Scrapie classica confermati in Gran Bretagna [252].

FORMAZIONE A DISTANZA

“Origine” degli alimenti, l’attuale quadro normativo UE e italiano

Validità: 1° marzo 2020 - 28 febbraio 2021

AUTORI: Carlo e Corinna Corra, *Avvocati ed Esperti di Legislazione degli Alimenti*

RESPONSABILE SCIENTIFICO: Giuseppe De Giovanni, *già dirigente del Ministero dello Sviluppo economico*

**10 crediti
ECM**

- Abbonati PVI: € 48,00
- Iscritti SIVeMP-SIMeVeP: € 64,00
- Non abbonati: € 80,00

Le manifestazioni cliniche maggiormente evidenti in questo studio di campo sono state il prurito (97%) e la perdita di peso (76%). Una significativa associazione è stata riscontrata tra presenza di tremori, alterazioni comportamentali, perdita di condizione corporea, andatura anomala, digrignamento dei denti, prurito ed altre manifestazioni cliniche. Questo studio ha confermato la variabilità dei segni clinici in corso di Scrapie, anche se quasi tutte le pecore hanno mostrato il prurito come sintomo pressoché costante. La presentazione clinica può essere dunque influenzata dal genotipo dell'ospite (ed, eventualmente, dalla razza, gregge o dal ceppo di agente predominante) [252].

Gli stessi Autori, avevano già dimostrato che i segni clinici più frequentemente riscontrati in corso di BSE nell'ovino sarebbero prurito, alterazioni comportamentali, alopecia, lesioni cutanee, digrignamento dei denti, tremore, atassia e perdita di peso, con la frequenza e la gravità di ciascuno dei sintomi che si accrescerebbero al progredire della malattia [251].

In uno studio più recente Simmons et al (2016), hanno riportato che anche la BSE nelle sue forme "atipiche" (BSE-L) può essere trasmessa sperimentalmente per via intracerebrale a pecore appartenenti a diversi genotipi ad eccezione degli animali con genotipo ARR/ARR. Il monitoraggio clinico, effettuato in diversi periodi post-infezione, ha evidenziato che il fenotipo sintomatologico non assomiglia a quello di alcun'altra TSE precedentemente conosciuta in questa specie. In particolare il prurito, con conseguente perdita del vello, nonché l'atassia sarebbero manifestazioni cliniche presenti in un esiguo numero di animali, risultando al contempo incostanti e indistinguibili da quelle riscontrate in corso di Scrapie classica e BSE classica sperimentalmente trasmessa all'ovino. Più frequentemente invece, gli animali affetti mostravano una particolare forma di malattia caratterizzata da episodi di collasso e riduzione del tono muscolare, spesso associati a concomitante abbassamento della testa e inizialmente attivati mediante semplici manualità quali ad esempio il sollevamento del collo oppure da eventi più stressanti come il moderato "courettage" del piede ai fini della visita clinica [428].

Al precipuo scopo di identificare e inquadrare correttamente i sospetti clinici, negli ultimi anni è stato messo a punto un protocollo finalizzato a valutare la presenza di segni clinici caratteristici associati a forme pruriginose e non pruriginose di TSE negli ovini, che potrebbe essere applicato anche alla specie caprina. In particolare, il protocollo comprende la valutazione del comportamento, la funzionalità visiva (risposta al riflesso della minaccia), la presenza di prurito e la valutazione dell'andatura degli animali. Il protocollo in oggetto permette lo *screening* di animali per i segni clinici di Scrapie entro un breve lasso di tempo. Esso può essere applicato, inoltre, a studi sperimentali in pecore e capre per monitorare l'esordio clinico, la progressione e la fase terminale della malattia. Anche se un esame clinico generalmente possiede un minor indice di sensibilità nel rilevare gli animali affetti da TSE rispetto ai

test *post mortem*, questo rappresenta, attualmente, l'unico metodo applicabile su animali vivi, soprattutto in quei Paesi che non dispongano di sistemi di sorveglianza adeguati atti all'identificazione delle TSE nei piccoli ruminanti [254].

Nella specie caprina, in caso sia di Scrapie che di BSE, le manifestazioni cliniche appaiono ben più variabili e poco costanti. I principali segni clinici sono costituiti in questa specie da iper-reattività agli stimoli esterni (con assenza di reazione alla minaccia), atassia, tremori e deficit posturali [253].

Per quanto attiene alla Scrapie "atipica", i segni clinici più frequentemente riscontrati sono rappresentati nella specie ovina da atassia, alterazioni comportamentali (movimenti di maneggio), perdita di peso, comparsa di uno stato ansioso/confusionale ed altri sintomi meno costanti come l'assenza di risposta al riflesso della minaccia unilateralmente o bilateralmente. Il dato costante, tuttavia, risulta essere l'assenza di prurito con successiva perdita del vello e comparsa di zone alopeciche, manifestazioni osservate pressoché costantemente sempre in corso di Scrapie classica [40, 88, 250].

Le caratteristiche neuropatologiche

All'esame necroscopico gli animali mostrano variabili e più o meno evidenti segni di deperimento organico, eventuali abrasioni cutanee causate dal grattamento, ma nessuna alterazione macroscopica a carico del sistema nervoso centrale (SNC), a eccezione (dato non sempre presente) di un modesto aumento del liquido cefalo-rachidiano associato ad una lieve ectasia dei ventricoli cerebrali [119]. Le lesioni microscopiche, rilevabili esclusivamente a livello di SNC, e, in particolare in corrispondenza dei nuclei telencefalici (*nucleus accumbens septi*), dei nuclei diencefalici (ipotalamici e talamici), del corpo striato, del peduncolo cerebellare, del cervelletto (corteccia e nuclei sottocorticali), del midollo allungato (nucleo motore dorsale del vago), della corteccia cerebrale (incostantemente) e del midollo spinale, risultano variabili per intensità e distribuzione. Tali lesioni, ripartite generalmente in maniera bilaterale e simmetrica, sono rappresentate da degenerazione spongiforme della sostanza grigia e, in minor misura, della sostanza bianca, nonché da degenerazione con conseguente perdita neuronale, spongiosi del neuropilo ed, infine, da astrogliosi/astrocitosi e presenza di depositi immunoistochimicamente evidenti di PrP^{Sc} [119, 264].

Alcuni studi condotti nella specie murina all'inizio degli anni '80 avevano rivelato che le suddette lesioni microscopiche interesserebbero principalmente la corteccia cerebrale e l'ippocampo [412]. Sono state descritte, successivamente, lesioni a carattere spongiforme a livello prosencefalico, cerebellare e della sostanza bianca [76].

La spongiosi o degenerazione ("*spongiform degeneration*") costituisce la lesione più caratteristica osservabile in corso di TSE (foto 1). Essa si caratterizza come un processo di vacuolizzazione neuronale, che comporta un'alterazione spongiforme del

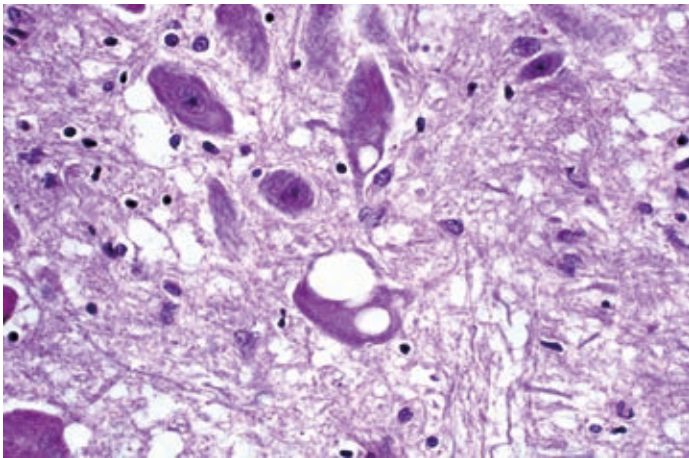


Foto 1. Scrapie, Pecora: evidente vacuolizzazione neuronale e spongiosi del neuropilo in sede cerebrale. Colorazione con ematossilina-eosina [119].

neuropilo della sostanza grigia, fenomeno che può variare dalla presenza di piccoli focolai disseminati a spongiosi diffusa. Il suo riscontro è particolarmente utile ai fini diagnostici, mentre la valutazione della sua intensità in una serie predeterminata di aree del SNC, attraverso l'assegnazione di uno specifico punteggio (*score*) per ogni area presa in considerazione, costituisce un'importante premessa per lo studio del cosiddetto "profilo neuro-istolesivo", indispensabile a sua volta al fine di poter classificare i vari ceppi di agente delle TSE.

Nella Scrapie ovina, la vacuolizzazione neuronale e la spongiosi si possono rinvenire talvolta associate ad altre alterazioni regressive quali la coartazione, l'iperbasofilia citoplasmatica, la cromatolisi centrale e la necrosi neuronale. Esse si riscontrano pressoché costantemente a livello di nucleo motore dorsale del nervo vago (DMNV), nonché della formazione reticolare e dei nuclei vestibolare mediale, cuneato laterale e palloniforme. Le indagini ultrastrutturali hanno confermato che tali lesioni coinvolgono gli elementi neuronali nel loro complesso (pirenoforo, assoni, dendriti) ed in minor misura le cellule gliali. La spongiosi si manifesterebbe con maggiore frequenza a carico della sostanza grigia cerebrale sotto forma di vacuoli di piccole dimensioni (1-2 μm), di forma tondeggianti od ovalare, che tendono a confluire tra di loro dando origine a strutture di grandezza maggiore ($\geq 50 \mu\text{m}$), presentandosi come caratteristici aggregati *morula-like* all'interno del neuropilo. I vacuoli intra-citoplasmatici possono presentare margini netti, essere singoli o multipli, a volte eccentrici e spesso otticamente vuoti, eccezion fatta per la presenza al proprio interno di alcuni granuli acidofili che rappresentano accumuli di frammenti di membrane plasmatiche in degenerazione. È utile ricordare che la distribuzione della spongiosi e la sua intensità sarebbero direttamente correlate al ceppo di agente responsabile e al genotipo dell'ospite, oltre che alla durata del periodo d'incubazione. Tali fattori sarebbero in grado di influenzare, in maniera più o meno importante, anche l'entità della stessa astrogliosi/astrocitosi,

nonché la topografia, le modalità di trasporto e la successiva deposizione di PrP^{Sc} a livello del tessuto cerebrale [119, 264, 274]. La spongiosi della sostanza bianca, evidenziabile solamente tramite indagini ultrastrutturali, prenderebbe origine dalla dilatazione palloniforme dei dendriti neuronali e dalla contemporanea vacuolizzazione del pericario. Al microscopio elettronico si osservano, inoltre, processi di vacuolizzazione degli assoni centrali dotati di guaina mielinica, con vacuoli che si presentano sia nell'assoplasma che nella guaina mielinica (edema intramielinico). Ulteriori danni ultrastrutturali sono costituiti dalla presenza di membrane proliferanti a carico del pericario neuronale, descritte come formazioni "a bulbo di cipolla", nonché da strutture tubulo-vescicolari accorpanti mitocondri e corpi multivescicolari, negli assoni e nei dendriti. Un altro reperto molto frequente in corso di Scrapie sperimentale nel criceto (ceppo 263K), così come in alcune TSE umane, seppur di più raro riscontro in corso di Scrapie sperimentale murina, è inoltre costituito dalla presenza di depositi extracellulari di PrP^{Sc} sotto forma di placche (placche amiloidee), nonché dalla presenza di depositi perivasali di PrP^{Sc} (angiopatia amiloide cerebrale) [119, 274, 389].

Nella Scrapie "atipica" il quadro neuro-istolesivo si presenta in maniera diversa rispetto alle lesioni osservate in corso di Scrapie classica. In particolare, la spongiosi risulta ben evidente nel cervelletto e nella corteccia cerebrale, mentre è assente nel tronco encefalico in particolare a livello di *obex* e di NMDV [39, 40].

L'immunohistochemica ha rivelato, successivamente, che l'accumulo di PrP^{Sc} si manifesta attraverso un'estesa deposizione a livello degli strati molecolare e granulare cerebellari, mentre la sostanza bianca mostra un elevato numero di immunodepositi sparsi associati alle fibre assonali ed al citoplasma oligodendrogliale. Queste caratteristiche forme di accumulo della PrP^{Sc} risultano in netto contrasto con quelle osservate nella Scrapie classica in cui i depositi risultano essere prevalentemente "subpiali", nonché a morfologia "stellata" e a localizzazione "perivacuolare" [243]. In uno studio del 2010 in cui si dimostrava la probabile coesistenza, nella specie ovina, della Scrapie "classica" e "atipica" (*Nor98*), il "pattern" neuro-istolesivo era caratterizzato dalla presenza di lesioni tipiche della Scrapie "classica" e della Scrapie "atipica" [315].

Per quanto riguarda la morfopatogenesi delle suddette lesioni a livello di SNC, la PrP^{Sc}, nel corso del processo neuroinvasivo, penetrerebbe all'interno dei neuroni e, in minor misura, negli astrociti e nelle cellule microgliali. In particolare, le cellule microgliali sarebbero colonizzate dall'agente prionico grazie al legame con uno specifico recettore ("Receptor for Advanced Glycation End-products", RAGE), con conseguente formazione di specie reattive dell'ossigeno ("Reactive Oxygen Species", ROS) e sviluppo del processo neurodegenerativo che inevitabilmente caratterizza tutte le malattie prioniche animali ed umane. Il ruolo delle cellule microgliali nella patogenesi delle lesioni, tuttavia, appare controverso. Alle stesse cellule è

infatti contestualmente attribuita una funzione difensiva nei confronti di numerose malattie neurodegenerative. Ciononostante, una volta penetrata all'interno delle suddette cellule, la PrP^{Sc} si andrebbe a localizzare nelle membrane delle cisterne dell'apparato del Golgi, situate tra la sede di sintesi e le vie di escrezione delle proteine. In tale distretto la PrP^C originante dalla membrana cellulare interagirebbe con la PrP^{Sc} e, quindi, a discapito della riserva di PrP^C, si formerebbe PrP^{Sc} che si accumulerebbe in maniera esponenziale a livello intracellulare. Questa particolare forma di "auto-replicazione" dell'agente sarebbe la causa diretta della vacuolizzazione neuronale. La PrP^{Sc} si accumulerebbe, inoltre, nei lisosomi, causando una dispersione del loro contenuto nel citoplasma, con conseguente sviluppo delle alterazioni vacuolari. La base biochimica di questa alterazione risiederebbe in un'attivazione diretta o indiretta di un canale ionico per il calcio (Ca²⁺) quali l'N-metil-D-aspartato (NMDA). Ciò provocherebbe l'aumento della concentrazione di ioni Ca²⁺ nel citoplasma neuronale, conseguente incremento dell'osmolarità cellulare e rigonfiamento idropico-vacuolare che è alla base della degenerazione spongiforme. Inoltre, l'ingresso di ioni Ca²⁺ all'interno della cellula potrebbe determinare l'attivazione del processo apoptotico, fenomeno attraverso cui avverrebbero, sia *in vivo* che *in vitro*, il danno regressivo e la conseguente perdita neuronale in corso di TSE, così come di altre patologie neurodegenerative quali ad esempio il morbo di *Alzheimer* [118, 141, 84].

In tale contesto si colloca uno studio del 2007 in cui viene valutata la correlazione positiva esistente tra l'accumulo di PrP^{Sc} a livello di determinate aree encefaliche e l'attivazione dell'apoptosi attraverso modificazioni nell'espressione dei geni *Bax* e *Bcl-2* in pecore affette da Scrapie naturale. Viene dimostrata, nel suddetto lavoro, la sovraespressione del gene *Bax* conseguente al deposito di PrP^{Sc}, ma nonostante questo non viene contestualmente rilevata l'attivazione di enzimi come la caspasi-3, probabilmente per contemporanea presenza di fattori neuro protettivi [282]. Tra i fattori potenzialmente neuroprotettivi vi sarebbe l'apporto, mediante la dieta, di alcuni metalli quali rame (Cu⁺⁺) e manganese (Mn⁺⁺). La somministrazione bilanciata di tali elementi avrebbe infatti un effetto protettivo nei confronti dell'apoptosi in topi Scrapie-infetti, senza tuttavia essere in grado di arrestare in maniera definitiva la morte neuronale [49]. Altri esperimenti condotti su animali *Bax-deleti* (*Bax*^{-/-}) non sono stati in grado di confermare il ruolo primario del suddetto gene proapoptotico nei confronti della morte cellulare programmata neuronale in corso di TSE. Infatti, l'inoculazione di topi *Bax*^{-/-} e animali "wild-type" di controllo con il prione della BSE adattato al topo non ha mostrato alcuna differenza significativa in termini di accumulo di PrP^{Sc}, neurodegenerazione, insorgenza della malattia ed evoluzione dei segni clinici, fornendo prove convincenti a sostegno dell'ipotesi che la morte cellulare *Bax*-mediata non fosse coinvolta nella neuropatogenesi del danno cellulare in corso di BSE [96]. Tuttavia, enzimi quali caspasi-3 e caspasi-9 sono

stati rinvenuti, contestualmente, nel cervello degli stessi animali *Bax*^{-/-}, suggerendo che l'apoptosi possa verificarsi attraverso meccanismi alternativi nelle TSE animali. La diminuzione del pool di PrP^C con conseguente perdita delle sue funzioni biologiche potrebbe essere, secondo alcuni studi, un altro possibile meccanismo alla base del processo neurodegenerativo che si verifica in corso di TSE [206]. Tuttavia, ulteriori indagini su topi transgenici (*Prnp*^{-/-}) indicherebbero che la malattia possa non derivare dalla perdita di funzione della PrP^C. Infatti, la delezione permanente o condizionale del gene *Prnp* nei topi non produrrebbe alcun fenotipo patologico [68, 301].

Altri studi hanno ipotizzato che alla base del processo neurodegenerativo possa esservi l'autofagia, intesa come un meccanismo protettivo per contrastare l'evoluzione della malattia a livello cellulare. In effetti la presenza di vacuoli autofagici all'interno del citoplasma di neuroni di pazienti affetti da TSE ha suggerito che l'autofagia possa svolgere un ruolo importante nella neurodegenerazione propria delle malattie prioniche e che possa al contempo contribuire alla genesi di quelle alterazioni spongiformi presenti nelle TSE [275, 338]. L'apoptosi e l'autofagia neuronale, inoltre, non si escluderebbero a vicenda, ma potrebbero essere due facce della stessa medaglia [268]. È utile sottolineare tuttavia, che anche se la morte cellulare e la degenerazione spongiforme sono elementi cardinali delle malattie prioniche, i primi cambiamenti rilevabili sarebbero associati a disfunzioni sinaptiche eventualmente indotte dall'accumulo di PrP^{Sc}, sia a livello centrale che a livello di giunzioni neuromuscolari, disfunzioni che comparirebbero molto precocemente rispetto ai segni di morte neuronale [240, 429]. Nelle fasi iniziali della malattia, la PrP^{Sc} si accumulerebbe all'interno del doppio strato lipidico di membrana dei neuroni, interagendo con alcune proteine implicate nei processi di neurotrasmissione quali caveolina e sinaptofisina, ed influenzando in tal modo l'attività sinaptica [393]. Anche in altre malattie neurodegenerative associate all'accumulo intracerebrale di proteine "anomale", le fasi iniziali della malattia sarebbero legate alla disfunzione sinaptica piuttosto che alla perdita neuronale [302, 416]. La disfunzione sinaptica sarebbe seguita da una perdita dendritica, con entrambe le alterazioni precedenti la morte neuronale [155]. Le succitate perdite dendritiche sarebbero pertanto correlate con la degenerazione spongiforme nelle fasi iniziali delle malattie prioniche. L'astrogliosi rappresenta di fatto un processo iperplastico che coinvolge gli astrociti e che caratterizza tutte le malattie da prioni, così come altre malattie neurodegenerative umane come il morbo di *Alzheimer*. Gli astrociti iperplastici sono costantemente presenti in tutte le aree cerebrali in preda a spongiosi e possono altresì mostrare un'iperbasofilia citoplasmatica come conseguenza dell'accumulo di glicogeno al loro interno. Possono essere messi in evidenza mediante tecniche di impregnazione argentea (esempio colorazione di *Cajal*), oppure mediante indagini immunostochimiche, mediante l'utilizzo di anticorpi nei confronti della proteina fibrillare acida gliale [119, 274].

L'astrocitosi è invece un processo ipertrofico il quale potrebbe essere conseguente all'astrogliosi. Un quesito importante a tal proposito riguarda la possibilità che l'attivazione gliale (astrocitosi/astrogliosi) sia innescata dall'accumulo di PrP^{Sc} direttamente, o piuttosto dalla degenerazione neuronale dovuta alla replicazione dei prioni. In primo luogo è utile sottolineare che l'attivazione astrocitaria sembra essere mediata da alcune citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina 1 (IL-1), attraverso il legame con uno specifico recettore chiamato CXCR-3 [71]; in secondo luogo alcuni studi in passato hanno rivelato che i geni associati all'ipertrofia/iperplasia delle cellule gliali sarebbero iper-espressi dopo che un quantitativo apprezzabile di PrP^{Sc} sarebbe rilevabile nel cervello, ma ben prima che qualsiasi segno di malattia o danno neuronale risulti evidente [229]. Questi risultati suggerirebbero pertanto che l'astrogliosi/astrocitosi possa rappresentare una risposta diretta all'accumulo di PrP^{Sc}.

Nei casi di malattia in cui il decorso risulti essere particolarmente lungo, la perdita neuronale con annessa gliosi astrocitaria sarebbero talmente intense da mascherare la spingiosi. Per questo motivo, alcuni Autori in passato hanno proposto la distinzione tra "*spongiform change*" (degenerazione spongiforme) e "*status spongiosus*" (stato spongioso) [311]. Quest'ultimo consisterebbe nella comparsa di ampie cavità irregolari all'interno del neuropilo, interposte tra una fitta rete di astrociti in attiva proliferazione. Lo "*status spongiosus*" non è da considerarsi specifico delle malattie da prioni, ma si può osservare anche in corso di altre malattie neurodegenerative caratterizzate da intensa perdita neuronale [274]. A tal proposito è utile sottolineare che nell'ambito della medicina umana esistono almeno una dozzina di proteine, fisiologicamente presenti nell'organismo, che condividono caratteristiche morfologiche, strutturali e biochimiche con i prioni. Numerosi studi hanno evidenziato che l'accumulo di forme mal ripiegate (*misfolded*) di tali proteine, provocherebbe diverse malattie neurodegenerative, come ad esempio il morbo di Alzheimer (AD), il morbo di Parkinson (PD), la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), il morbo di Huntington, le Atassie Spinocerebellari (AS) e le Taupatie [381, 434]. Sebbene queste neuropatie si differenzino dalle TSE per una serie di caratteristiche cliniche e patologiche, sarebbero tuttavia accomunate alle TSE dal meccanismo patogenetico di base, vale a dire l'aggregazione e il successivo accumulo di proteine "anomale" come causa di malattia [474].

Le principali proteine individuate fino ad ora sono: la proteina APP, la proteina Tau, l' α -sinucleina, la superossido-dismutasi 1 (SOD1) e l'Huntingtina. Ognuna di queste proteine ha la capacità di aggregarsi in fibrille in determinate condizioni e formare placche amiloidi, presentando forti analogie con quanto avviene in corso di TSE. Le patologie che ne derivano sono definite Malattie Neurodegenerative Sporadiche (NDS), poichè la maggior parte sono appunto di natura sporadica e solo il 10-20% sono ereditarie. Questo vale per CJD, AD, PD, Taupatie e SLA, ma non per il Morbo di Huntington, che

invece è esclusivamente ereditario (381). Attualmente, queste proteine non possono essere definite veri e propri prioni, poiché presentano molte caratteristiche comuni, ma anche una serie di differenze rispetto alla PrP^C come ad esempio la loro incapacità di essere trasmissibili in condizioni naturali. Non essendo possibile catalogarle come prioni, sono state denominate "*prionoidi*" [471]. Il deposito e l'accumulo di sostanza amiloide che contraddistingue tutte le TSE umane ed animali consiste nella progressiva deposizione di PrP^{Sc} a livello di SNC ma anche in una serie di altri distretti extra-cerebrali. In corso di Kuru, vCJD, BASE, nonché nei modelli di Scrapie murina si osserva frequentemente il deposito di placche amiloidi in sede extracellulare. La presenza di sostanza amiloide può essere dimostrata mediante l'utilizzo di idonee tecniche istochimiche (rosso Congo), immunoistochimiche e ultrastrutturali. Le placche amiloidi presentano una conformazione tipica, essendo costituite, nello specifico, da un *core* congofilo e immunoreattivo nei confronti degli anticorpi anti-PrP^{Sc}, circondato a sua volta da neuriti distrofici. La morfologia esatta delle suddette placche varia però fra i diversi tipi di TSE. Ad esempio, nel Kuru esse sono formate da un *core* stellato e da un numero ridotto di neuriti distrofici, mentre nella GSS le placche appaiono multicentriche e nella vCJD appaiono circondate da un alone di spongiosi (cosiddette "*placche floride*"), risultando altresì presenti nella corteccia cerebrale e cerebellare [274]. Nella Scrapie ovina, il deposito di sostanza amiloide varia consistentemente a seconda della razza considerata, del genotipo, nonché del ceppo di agente in questione. In uno studio del 2004 è stata dimostrata la presenza di sostanza amiloide in sede perivascolare, in particolare nel talamo e nel mesencefalo [276].

Fino a poco tempo fa le uniche lesioni dimostrabili in corso di TSE interessavano il SNC; sappiamo tuttavia che i prioni possono accumularsi in grandi quantità in altri distretti anatomici, come per esempio nei tessuti linfatici dell'ospite. Uno studio di McGovern (2007) ha dimostrato altresì che, in corso di Scrapie, le FDCs residenti in sede splenica subirebbero una serie alterazioni microscopiche [324].

Più recentemente, alcune indagini ultrastrutturali effettuate su topi infettati con l'agente della Scrapie hanno dimostrato la presenza di sostanza amiloide in tessuti extra-neurali, tra cui cuore, grasso bruno, grasso bianco e colon. I depositi di PrP^{Sc} identificati erano osservabili, anche intorno ai vasi sanguigni a livello di tessuto cardiaco, grasso bruno, grasso bianco, colon e tessuti linfoidi. Microscopicamente, la deposizione di PrP^{Sc} era presente all'esterno e all'interno delle membrane plasmatiche degli adipociti del grasso bruno e nei cardiomiociti, ove la stessa sembrava provocare invaginamenti e distruzione delle membrane plasmatiche di questi tipi cellulari. Al contrario, nessun danno cellulare appariva evidentemente associato ai macrofagi dei tessuti linfoidi e del colon, nonché alle cellule gangliari neuronali enteriche del colon e agli adipociti del grasso bianco [384].

Patogenesi e ruolo del sistema nervoso autonomo nella Scrapie ovina

Tra gli obiettivi principali che la ricerca scientifica ha perseguito nel tempo relativamente allo studio delle TSE, vi è sicuramente quello relativo alla caratterizzazione della complessa sequenza patogenetica dell'infezione a partire dal primo contatto che il prione realizza con l'organismo ospite, fino alla cosiddetta "neuroinvasione", vale a dire quel lungo viaggio che lo porterà a colonizzare il SNC dello stesso [8, 11, 289].

Come più volte precisato in precedenza, le vie di ingresso dei prioni all'interno di un organismo ospite possono essere molteplici, per quanto la via orale rappresenti sicuramente, in corso di infezione naturale, la principale porta di accesso per questo tipo di agenti patogeni, come peraltro confermato da numerosi studi sperimentali effettuati su roditori e su animali domestici [292].

A tal proposito, numerosi studi sperimentali condotti in passato, hanno dimostrato che il sistema nervoso enterico (*Enteric nervous system*, ENS) svolgerebbe, unitamente alle placche del Peyer (*Peyer's patches*, PPs), un ruolo fondamentale nelle fasi precoci dell'infezione in corso di molte TSE, come per esempio, nella vCJD dell'uomo (209), nella Scrapie ovina [8, 11, 17, 113, 199, 200, 289, 394, 463, 465, 466], nella Scrapie sperimentale dell'*hamster* [36, 37] e nella CWD dei cervidi [421].

In effetti, dopo l'infezione orale e prima di colonizzare il SNC, i prioni tendono a localizzarsi a livello dei tessuti linfatici dell'ospite; questo dato è comune a molte TSE ed è stato ampiamente documentato in corso di Scrapie ovina [85, 113, 131, 132, 197, 198, 394, 462, 464, 466], nonché di encefalopatia spongiforme trasmissibile del visone (*transmissible mink encephalopathy*, TME) [183] e vCJD dell'uomo [209].

I prioni possono persistere nei tessuti linfatici dell'ospite per tutta la durata dell'infezione, sebbene ciò sia ampiamente influenzato dalla specie in questione, nonché dal ceppo di agente responsabile. Ad esempio, in corso di BSE l'accumulo di PrP^{Sc} all'interno delle PPs di bovini infetti sarebbe molto limitato, mentre sarebbe molto significativo nei tessuti linfatici di pazienti umani affetti da vCJD e di ovini sperimentalmente infetti [146, 447, 473]. Si possono osservare differenze significative anche all'interno di una popolazione di animali appartenenti alla stessa specie. Ligios *et al* (2006) hanno dimostrato, mediante indagini immunoistochimiche ed immunobiochimiche effettuate su un elevato numero di capi, che la presenza di PrP^{Sc} nei tessuti linfatici si attesterebbe su percentuali diverse a seconda dello stadio dell'infezione, risultando più elevata nella fase pre-clinica (26%) e ancor più modesta nella fase sintomatica (6%) [278]. Inoltre, in alcuni casi, i polimorfismi del gene *PRNP* influenzerebbero la distribuzione della PrP^{Sc}

nei tessuti linfatici dell'ospite in corso di Scrapie ovina [39, 241] e di sCJD [165].

A seguito dell'infezione *per os*, l'agente della Scrapie tende ad accumularsi nel tessuto linfatico associato all'intestino (*Gut-Associated Lymphoid Tissues*, GALT) [214, 376]. Il GALT comprende una raccolta di strutture multifollicolari, tra cui le tonsille palatine, le placche del Peyer, l'appendice vermiforme del cieco, le placche del colon e del cieco e un numero di piccole strutture follicolari denominate follicoli linfatici isolati (*Isolated Lymphoid Follicles*, ILFs). Questi tessuti sono localizzati nell'intero tratto gastrointestinale (*Gastrointestinal Tract*, GIT) e, insieme ai linfonodi mesenterici, aiutano a proteggere l'ospite dalle infezioni.

Gli ILFs nell'intestino possono essere classificati come ILFs immaturi (singoli follicoli con cellule B primarie) o ILFs maturi, contenenti un singolo centro germinativo ospitante a sua volta linfociti B organizzati ed una rete di cellule specializzate denominate cellule follicolari dendritiche (*Follicular Dendritic Cells*, FDCs) (166, 121).

Alcuni studi hanno dimostrato che gli ILFs maturi contenenti FDCs costituirebbero nuovi, precedentemente non riconosciuti, siti intestinali di replicazione prionica precedente la neuroinvasione. Infatti, topi che manchino di strutture organizzate come le PPs, ma che alberghino al contempo numerosi ILFs contenenti FDCs in tutto il loro intestino mostrerebbero patogenesi e suscettibilità nei confronti delle malattie prioniche inalterate a seguito di esposizione orale rispetto ai controlli [166].

I prioni si accumulano sia nel GALT del piccolo intestino che a livello tessuto linfoide associato al grosso intestino, come a livello del tessuto linfoide associato alla mucosa retto-ale (*Recto-anal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, RAMALT). L'accumulo della PrP^{Sc} all'interno del RAMALT nelle specie affette da Scrapie e CWD [171, 489] nonché in sede tonsillare ed in corrispondenza dell'appendice cecale di pazienti umani affetti da vCJD, ha ricevuto un'attenzione significativa poiché è stato usato per identificare gli animali infetti nello stadio preclinico della malattia e per ottenere informazioni sulla possibile prevalenza della vCJD nel Regno Unito [161, 210]. È importante sottolineare, a questo proposito, che in corso di infezione naturale (orale), l'accumulo di prioni a livello di RAMALT risulterebbe secondario rispetto al coinvolgimento del GALT del piccolo intestino [121, 452, 464].

A dimostrazione di ciò, numerosi studi hanno evidenziato, in passato, un aumento dell'infettività a livello dell'ileo distale [462], nonché un accumulo precoce di PrP^{Sc} a carico dei noduli linfatici isolati presenti sia nel GIT che nelle tonsille [289, 394]. Questi accumuli sarebbero accompagnati da contemporanei fenomeni di replicazione locale del prione e dalla successiva

diffusione ai follicoli linfatici adiacenti [394]. La successiva diffusione ai distretti linfatici più distanti dal GIT farebbe presupporre che la diffusione linfo-ematogena possa giocare un ruolo importante nella patogenesi dell'infezione [394].

Dopo esposizione orale i prioni colonizzano i linfonodi mesenterici [218, 225]. Nonostante ciò l'assenza degli stessi non influenzerebbe il processo neuroinvasivo o la suscettibilità alla malattia [121, 166]. Ciò implica che la carica infettante che inizialmente colonizza i linfonodi mesenterici subito dopo l'esposizione orale non sarebbe sufficiente, da sola, per stabilire un efficace processo di neuroinvasione. La condizione necessaria e sufficiente affinché ciò si verificasse sarebbe invece, l'accumulo e la moltiplicazione dell'agente prionico all'interno delle FDCs del GALT del piccolo intestino. Coerentemente con la conclusione che il GALT del tratto gastrointestinale superiore sia il sito essenziale dell'accumulo dei prioni e della neuroinvasione dopo l'esposizione orale, anche l'assenza della milza non influenzerebbe la patogenesi o la suscettibilità alla malattia nel topo [53, 248].

I molteplici studi condotti nel corso degli anni ci consentono attualmente di affermare che a seguito dell'esposizione orale, l'accumulo precoce e la replicazione dei prioni all'interno delle FDCs residenti nel GALT, in particolare a livello di PPs, sarebbero essenziali per un'efficace neuroinvasione [6, 8, 11, 17, 121, 287, 289, 376, 394, 466].

Le placche di Peyer

Affinché l'agente della Scrapie possa invadere le suddette strutture linfatiche, è condizione necessaria l'attraversamento dell'epitelio della mucosa intestinale. Le cellule epiteliali intestinali, infatti, sono dotate di specifiche giunzioni serrate (*tight junctions*) che costituiscono fisiologicamente una solida barriera nei confronti di qualsivoglia *noxa* patogena.

Riteniamo utile in questo momento, prima di procedere con la descrizione del processo evolutivo-patogenetico che culminerà con la neuroinvasione, descrivere brevemente le caratteristiche istologiche che riguardano le placche del Peyer, (PPs).

Le PPs sono costituite da noduli linfatici situati nella sottomucosa, attorno ai quali si distribuisce uno strato di linfociti B. La regione internodulare è ricca di linfociti T e di vene post-capillari. Al di sopra dell'epitelio follicolo-associato (*Follicle Associated Epithelium*, FAE), che riveste i suddetti noduli linfatici, è presente la *Dome Area*. I noduli linfatici sono costituiti da un centro germinativo che ospita al suo interno linfoblasti B, FDCs, macrofagi e linfociti T [109].

Il FAE che riveste le PPs contiene una popolazione unica di cellule epiteliali fagocitarie (*Microfold Cells*, cellule M). Queste cellule sono specializzate per la transitosi di antigeni partecellari e microrganismi dal lume intestinale nel GALT (291). Numerosi studi supportano l'ipotesi che anche i prioni, come molti altri agenti patogeni, possano sfruttare la capacità di trasporto transepiteliale delle cellule M per attraversare la

barriera mucosale intestinale e raggiungere le PPs sottostanti [120, 122, 203, 332, 444]. Alcuni Autori, mediante studi *in vitro*, hanno dimostrato che l'accumulo di prioni nel GALT e la suscettibilità alla malattia dopo esposizione orale risulterebbero entrambi ridotti nei topi privi di cellule M o nei topi in cui le cellule M siano state transitoriamente "inattivate" prima dell'infezione [120]. Altri studi che hanno utilizzato ceppi di Scrapie adattati al topo [203], nonché l'agente della BSE adattato alla specie murina [332], oltre a infezioni sperimentali nell'*hamster* [36], indicano che le cellule M svolgerebbero un ruolo importante nel passaggio della PrP^{Sc} attraverso l'epitelio intestinale.

Vi è da notare, tuttavia, che questi studi ad oggi non hanno ancora trovato conferma *in vivo* e che esisterebbero meccanismi alternativi di captazione dei prioni dal lume intestinale che prevedono la possibilità, da parte degli stessi, di essere complessati con la ferritina e di subire un processo di transitosi mediato dagli enterociti [330]. Altre ipotesi chiamerebbero in causa le cellule dendritiche (*Dendritic Cells*, DCs) le quali potrebbero fagocitare i prioni direttamente nel lume enterico inserendo i propri prolungamenti citoplasmatici tra le *tight junctions* dell'epitelio intestinale [292, 387]. Pertanto, come alcuni altri agenti patogeni, i prioni potrebbero anche sfruttare la DCs per stabilire l'infezione, magari utilizzandole come cavalli di Troia". Tale ipotesi sarebbe supportata dall'osservazione che alcune DCs migranti dall'intestino nella linfa mesenterica afferente acquisirebbero la PrP^{Sc} dopo la sua inoculazione nel lume intestinale [218].

Altre ipotesi di coinvolgimento cellulare

Altre teorie chiamano in gioco le cellule entero-endocrine quali possibili elementi in grado di trasportare i prioni attraverso la parete intestinale poiché tali cellule esprimono livelli di PrP^C paragonabili a quelli dei neuroni dell'ENS, cosa che renderebbe quindi plausibile un loro ruolo nella replicazione primaria del prione [105, 394].

Tra tutte le diverse popolazioni cellulari potenzialmente coinvolte nella patogenesi delle TSE, quelle che avrebbero un ruolo cruciale sono rappresentate dalle FDCs, che risultano essere numerose nei follicoli linfatici primari e nei centri germinativi dei tessuti linfatici [240]. È obbligatorio a questo punto fare le dovute distinzioni tra le FDCs e le DCs. Tra le due linee cellulari esistono, infatti, profonde differenze sia per quanto riguarda l'origine, sia dal punto di vista morfologico e funzionale. Le DCs hanno derivazione mieloide, sono mobili, svolgono attività fagocitaria e rientrano nella sottoclasse delle "cellule presentanti l'antigene" (*Antigen Presenting Cells*, APC) [373]. Le FDCs, invece, derivano da un precursore stromale (232), sono immobili e non svolgono attività fagocitaria [237, 290]. Le FDCs esprimono alti livelli di PrP^C [58, 62, 235, 319] e questo permette loro di accumulare PrP^{Sc}. Nei topi transgenici, resi incapaci di esprimere la PrP^C a livello delle sole FDCs,

la progressione dell'infezione risulterebbe infatti totalmente inibita, unitamente alla replicazione del patogeno e di fatto, risulterebbe notevolmente ritardata la neuroinvasione [284, 287, 333, 319].

Dal punto di vista morfologico, le FDCs sono dotate di processi dendritici sottili che si estendono in tutto il follicolo tra le cellule B. Questi dendriti consentono alle FDCs di intrappolare e trattenere grandi quantità di antigeni nativi sulle loro superfici sotto forma di immunocomplessi, costituiti da complessi antigene-anticorpi e/o composti opsonizzati dal complemento. La membrana plasmatica delle FDCs è inoltre dotata di recettori specifici per la frazione costante delle immunoglobuline (Fc) e per alcune componenti del complemento (*Complement Receptor Type 1*, CR1; *Complement Receptor type 2*, CR2). Questa complessa organizzazione morfologica e funzionale consente loro di captare e trattenere complessi macro-molecolari [236, 461]. Il confronto dei contributi relativi dei recettori CR1 e CR2 ha rivelato un ruolo più importante per il CR2 nella patogenesi delle malattie da prioni [231].

Altre componenti del complemento quali il fattore C1q e il fattore proteico regolatorio H possono legarsi alla PrP^{Sc} [331, 420]. L'assenza specifica di componenti opsonizzanti del complemento (C1q, C2, C3, C4 e fattore H) o di espressione del CR2 sulle FDCs impedirebbe altresì l'accumulo di prioni nei tessuti linfatici della milza e ne ritarderebbe la neuroinvasione [236, 285, 326, 327, 496].

Gli immunocomplessi che vengono trattiene dalle FDCs sarebbero inizialmente internalizzati prima di subire ripetuti cicli di "visualizzazione" sulla superficie cellulare [195].

Questa modalità ciclica di espressione del complesso immunitario aiuterebbe a proteggere gli antigeni dalla degradazione, consentendo loro di essere trattiene per periodi molto più lunghi [196]. Nonostante ciò, analisi immunoistochimiche ad alta risoluzione indicano che la replicazione del prione si verificherebbe sulla superficie delle FDCs, poiché la PrP^{Sc} non è stata rilevata al loro interno [238, 240, 323, 325, 422]. Anche altre popolazioni cellulari facenti parte del GALT prendono parte in maniera significativa al processo neuroinvasivo. È il caso specifico dei "macrofagi a corpo tingibile" (*Tingible Body Macrophages*, TBM), cellule residenti specificamente all'interno dei centri germinativi dei follicoli linfatici. Questi macrofagi sono caratteristicamente sovraccarichi di resti di linfociti apoptotici fagocitati (corpi tingibili) e durante la malattia prionica contengono anche consistenti accumuli di PrP^{Sc} all'interno dei loro compartimenti endosomiali [319, 325, 238]. Il ruolo patogenetico dei macrofagi in corso di TSE è ancora incerto; alcuni dati suggeriscono che essi possano

degradare ed eliminare i prioni nel tentativo di proteggere l'ospite dall'infezione [74, 41, 289, 300].

Sebbene molto spesso, come precedentemente descritto, la replicazione degli agenti prionici all'interno delle FDCs sia una tappa fondamentale nella patogenesi della malattia, sono stati riportati casi in cui l'accumulo di prioni nel GALT e/o la neuroinvasione si verificherebbero indipendentemente dalle FDCs. I fattori che attribuiscono un ruolo centrale alle FDCs nella patogenesi delle TSE sono incerti, sebbene ciò possa essere influenzato dal ceppo prionico, dalle specie ospiti, dal genotipo PRNP e dalla via di trasmissione/infezione. La dose infettante, per esempio, può influenzare la suscettibilità alla malattia, poiché alte dosi potrebbero "bypassare" l'esigenza di amplificazione negli organi linfoidi secondari (*Secondary Lymphoid Organs*, SLOs) prima della neuroinvasione [375]. Il ceppo prionico ed il genotipo PRNP dell'ospite possono influenzare, come già detto, la patogenesi della malattia negli

ovini [17, 198]. In altri casi, come per esempio nella CJD

sporadica dell'uomo, l'accumulo precoce di prioni nei tessuti periferici, tra cui gli SLOs potrebbe

non risultare determinante [165], così come

la suscettibilità del topo al prione della CJD non sarebbe influenzata dall'assenza di linfociti B maturi e di FDCs [418].

Si ritiene che nella BSE del bovino vi sia un limitato coinvolgimento dello SLOs durante la fase preclinica dell'infezione [433], sebbene la PrP^{Sc} sia stata rilevata nell'intestino tenue della maggior parte degli animali a seguito di infezione sperimentale (per via orale) così come in alcuni bovini dopo esposizione naturale [211, 447, 478].

Tuttavia, quando si realizza la trasmissione della BSE ad altre specie come l'uomo (sotto

forma di vCJD), nonché a pecore e topi, l'accumulo di PrP^{Sc} nei tessuti linfoidi costituirebbe un reperto pressoché costante [59, 145, 207].

In ogni caso l'accumulo di PrP^{Sc} a livello delle FDCs non comporterebbe alcuna alterazione morfologicamente apprezzabile [319], in quanto - come ben noto - in corso di TSE umane e animali le lesioni sarebbero confinate al SNC [119]. Tuttavia, lo studio ultrastrutturale dello SLOs, in corso di malattia, ha rivelato l'esistenza di cambiamenti morfologici a carico delle FDCs. Questi includono cicli di maturazione influenzati negativamente, anomali ripiegamenti dendritici ed eccessivo accumulo di complessi immuni tra i dendriti delle FDCs [323]. Ulteriori studi hanno dimostrato che altri tipi cellulari potrebbero rivestire un ruolo importante nella patogenesi delle TSE. Assumono particolare importanza, in tale contesto i linfociti B. Tra le tante funzioni svolte da queste cellule del sistema immunitario, quella più importante nel nostro caso è sicuramente la produzione di importanti citochine, quali le



linfotossine di membrana $\alpha 1$ e $\beta 2$ (LT) e il “*tumor necrosis factor α* ” (TNF- α), fondamentali sia nella maturazione che nel mantenimento nello stato differenziato delle FDCs nei centri germinativi. Infatti, topi “*knockout*”, deprivati dei geni codificanti per LT- α , LT- β , nonché di linfociti B hanno mostrato una ridotta efficienza nella replicazione prionica, in quanto privi di FDCs [105].

Dopo aver risieduto nelle PPs, le cellule B migrano verso i linfonodi mesenterici e quindi ritornano in circolo [410]. Le cellule B possono ricircolare tra i tessuti linfoidei per diverse settimane [456] e spesso acquisiscono antigeni dalle FDCs mentre migrano attraverso i centri germinativi [443]. Studi su topi hanno suggerito che anche le cellule B circolanti sarebbero coinvolte nella diffusione iniziale dei prioni dai tessuti linfoidei ad altri SLOs. Quando la migrazione delle cellule B tra SLOs viene specificamente bloccata, anche la diffusione dei prioni dallo SLO drenante ad altri SLOs verrebbe bloccata [334]. Se lo stesso si verifici nelle infezioni naturali è incerto, ma i prioni sono stati rilevati in associazione con linfociti B (20, 126) nel sangue di pecore con Scrapie [127] e di cervi con CWD [313].

In netto contrasto con quanto avviene nelle infezioni da altri microrganismi patogeni, topi deprivati delle cellule B e delle cellule T mature del sistema immunitario, quali i topi affetti da SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) e i topi Rag-1^{-/-}, Rag-2^{-/-} e Agr^{-/-} risulterebbero refrattari nei confronti delle infezioni prioniche [153, 154, 233, 234]. Tuttavia, le cellule T non svolgerebbero affatto un ruolo importante nella patogenesi della malattia da prioni. È stato osservato, infatti, che l’accumulo di prioni negli SLOs e la successiva neuroinvasione non sarebbero compromessi nei topi timectomizzati carenti delle sole cellule T o nei topi transgenici con carenze specifiche delle cellule T (CD4^{-/-}, CD8^{-/-}, $\beta 2\text{-}\mu$ ^{-/-}, TCR α ^{-/-} o Perforina^{-/-}) [152, 322]. Le cellule T, inoltre, sembrano mancare dei fattori cellulari necessari per sostenere l’infezione da prioni come l’espressione di alti livelli di PrP^C [386]. Nel caso specifico delle cellule B, invece, alcuni studi hanno dimostrato che l’accumulo di prioni nella milza e la successiva neuroinvasione sarebbero entrambi significativamente ridotti in animali deprivati delle suddette cellule [234]. Purtroppo, le cellule B non permetterebbero la replicazione prionica, come dimostrato da studi effettuati su topi transgenici che esprimono alti livelli di PrP^C solo sui linfociti B [336]. Ciò indica che le cellule B potrebbero probabilmente svolgere un ruolo indiretto nella patogenesi delle malattie da prioni, forse attraverso la fornitura di supporti omeostatici ad altre popolazioni di cellule.

Poiché la fitta rete costituita dalle FDCs si trova a una certa distanza dal FAE, così come dai sottostanti plessi dell’ENS, la diffusione dell’agente patogeno dal GALT al SNC, passando proprio attraverso i suddetti plessi, costituirebbe secondo alcuni Autori una fase cruciale nella patogenesi dell’infezione [34, 105, 199, 318, 394, 421, 464].

Il coinvolgimento delle cellule nervose

Le cellule dell’ENS sarebbero le prime cellule nervose, in ordine cronologico, ad essere colonizzate dai prioni in seguito ad infezione orale, dal momento che sia i neuroni che le cellule enterogliali (*Enteroglial Cells*, EGC) residenti in tali distretti esprimono alti livelli di mRNA codificanti per la PrP^C (140) e possono altresì albergare PrP^{Sc} (foto 2). L’accumulo di PrP^{Sc} è stato ampiamente dimostrato in corrispondenza dei neuroni dell’ENS immunoreattivi nei confronti della calbindina (CALB), dell’ossido nitrico sintetasi (*neuronal Nitric Oxide Synthase*, nNOS) e della somatostatina (SOM), in corso di scrapie ovina naturale e sperimentale [307, 411].

Nonostante ciò, a livello dei plessi dell’ENS non si realizzerebbe alcun danno neuronale, come invece avviene a carico del SNC [13, 307, 394, 409]. Il trasferimento dei prioni dai centri germinativi dei follicoli linfatici verso i plessi dell’ENS avviene con modalità non del tutto note. Tuttavia, è alquanto improbabile che tale diffusione possa realizzarsi direttamente poiché le FDCs occupano sedi anatomiche diverse rispetto alle fibre nervose, sono immobili e solo raramente stabiliscono intime relazioni sinaptiche [108, 135, 308]. L’innervazione degli organi linfatici, compreso il GALT, è principalmente sostenuta dalla componente adrenergica del sistema nervoso autonomo (SNA). In particolare, l’arborizzazione nervosa dell’ileo è costituita da fibre post-gangliari della catena simpatica paravertebrale e dei nervi splanchnici. Le PPs ricevono fibre nervose provenienti dai gangli mesenterici che, attraversando il peritoneo, formano un plesso i cui rami raggiungono gli spazi interfollicolari e la lamina propria [134].

Alcuni studi condotti sull’effettiva innervazione dell’ileo hanno dimostrato che la rete di fibre nervose si localizza per lo più a livello dello stroma interfollicolare e perfollicolare, mentre le fibre intrafollicolari sono piuttosto rare. Non sono state riscontrate, inoltre, differenze significative nella densità delle fibre nervose presenti a livello di PPs di ovini sani rispetto a quelle presenti in ovini di razza Sarda affetti da Scrapie, né tantomeno tra ovini con genotipi (genotipo PrP) differenti (ARQ/ARQ, ARR/ARQ, ARR/ARR). Negli ovini adulti, sia Scrapie-free sia Scrapie-infetti, sono state altresì riscontrate fibre nervose nella *dome area*, in prossimità del FAE. Gli stessi studi hanno infine documentato la presenza di una fitta rete di fibre nervose “*tirosin-idrossilasi (TH)-immunoreattive (IR)*” in corrispondenza dei plessi dell’ENS [85, 309].

Il trasferimento dei prioni verso l’ENS potrebbe essere mediato da cellule mobili. Le FDCs, pur essendo cellule immobili, potrebbero trasferire passivamente l’agente infettivo alle fibre nervose circostanti mediante vescicole secretorie [238, 376]. Una notevole quantità di dati, però, supporta l’ipotesi che le DCs possano svolgere un ruolo di grande importanza nella diffusione prionica. In particolare, sono state descritte alcune connessioni anatomiche esistenti tra le DCs e le cellule presenti nei plessi dell’ENS [108, 123, 124, 217], nonché un aumento

numerico delle stesse DCs in corso di TSE [23, 92]. Inoltre, studi realizzati su modelli murini transgenici in cui erano state eliminate le DCs hanno dato dimostrazione che la deposizione di PrP^{Sc} nei tessuti linfoidei verrebbe di fatto impedita [23, 92]. Un quesito altrettanto importante riguarda il trasferimento intercellulare degli agenti delle TSE, ossia la trasmissione dei prioni dalle DCs alle FDCs, così come dalle DCs ai plessi dell'ENS. Questo trasferimento potrebbe essere mediato da vescicole provviste di membrana sulla quale è presente la PrP^{Sc}, che sono coinvolte nel trasporto di altri agenti patogeni a localizzazione intracellulare [79, 111, 112, 136, 179]. Alcuni studi hanno proposto l'esistenza di un'ulteriore potenziale forma di comunicazione intracellulare a distanza, mediata da piccole strutture citoplasmatiche cilindriche capaci di collegare cellule vicine tra loro e chiamate *tunneling nanotubes* (TNTs) [180]. All'interno dei TNTs la PrP^{Sc} sembrerebbe viaggiare in vescicole endosomali. Resta da stabilire se il trasferimento significativo di prioni tra le cellule mediato da TNTs avvenga anche nell'ambiente dinamico dei tessuti linfoidei *in vivo* [495]. Altri studi *in vitro* hanno dimostrato che le DCs, dopo aver ospitato e accumulato al loro interno la PrP^{Sc}, sarebbero in grado di trattenerla per alcune ore indipendentemente dai loro livelli di espressione della PrP^C. Successivamente le stesse cellule trasferirebbero la PrP^{Sc} a cellule nervose coltivate nello stesso ambiente e questo trasferimento sarebbe mediato proprio dai TNTs. Questi ultimi sarebbero pertanto in grado di favorire il passaggio dei prioni tra i neuroni stessi [265].

Correlazione tra stato di salute e patogenesi

La maggior parte degli studi sopra citati descrive la patogenesi delle malattie da prioni in animali e pazienti in ottimale stato di salute. Tuttavia, è interessante approfondire l'argomentazione sulle condizioni di alterata omeostasi che si possono verificare contemporaneamente all'infezione prionica. Certi processi infiammatori, per esempio, potrebbero avere un impatto significativo sulla patogenesi delle malattie da prioni, sia aumentando la captazione dei prioni dai siti iniziali di infezione, sia espandendo la loro distribuzione tissutale. Le patologie infiammatorie della mucosa intestinale, come quelle osservate in corso di colite batterica [425], unitamente all'aumento della densità delle cellule M a livello dell'epitelio intestinale [122], ed alcune lesioni alle superfici mucose delle cavità orali [110] o nasali [102], possono modificare significativamente la suscettibilità alla malattia, probabilmente aumentando la captazione prionica. Anche l'immunizzazione ripetuta nei confronti di qualsivoglia antigene durante il periodo di esposizione prionica può aumentare la suscettibilità alla malattia. Le infiammazioni croniche a carattere linfoproliferativo, inducendo la formazione di tessuti linfoidei terziari ectopici contenenti FDCs, potrebbero espandere la distribuzione dei prioni all'interno dell'ospite infetto, soprattutto a livello di pancreas, fegato e rene [121, 166, 192, 201, 415]. Gli effetti dell'infiammazione cronica sulla

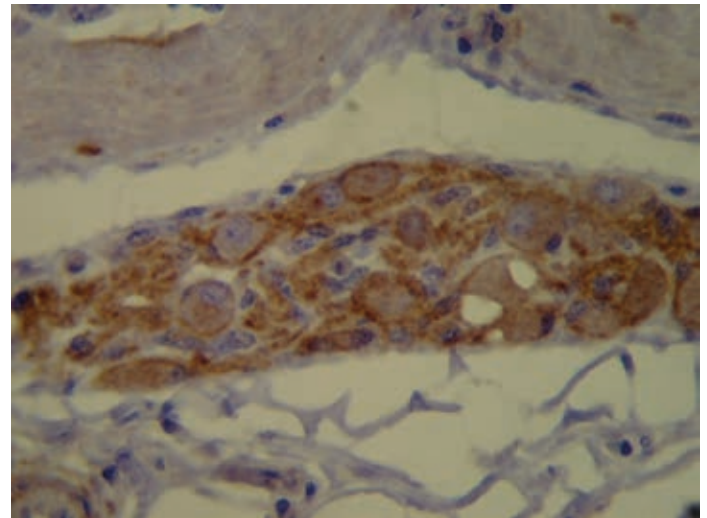


Foto 2. Ovino. Ileo. Scrapie. Intensa deposizione di PrP^{Sc} a livello del plesso dell'ENS. Immunoistochimica per la PrP^{Sc}; colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, forte ingrandimento.

patogenesi delle malattie da prioni potrebbero avere importanti conseguenze sulla salute umana e animale favorendo la loro trasmissione verticale e orizzontale, così come aumentando la concentrazione dei prioni escreti nel latte (soprattutto in animali con mastite) o eliminati con le urine (soprattutto in animali con nefrite) [280, 297].

Il processo neuroinvasivo

Il processo neuroinvasivo continuerebbe per diffusione retrograda dei prioni lungo le fibre efferenti della componente simpatica e parasimpatica del SNA [26, 34, 238, 316, 317]. Il coinvolgimento del sistema nervoso simpatico è stato più volte dimostrato soprattutto in corso di Scrapie sperimentale nell'*hamster* [316]. Ulteriori indagini sperimentali hanno rafforzato ulteriormente queste ipotesi, dimostrando che la simpatectomia ritarderebbe la neuroinvasione [164]; viceversa, la progressione dell'infezione sarebbe accelerata nei topi in cui la densità dei nervi simpatici all'interno degli SLOs è aumentata [164], o in quelli in cui la distanza tra FDCs e nervi simpatici è ridotta [376]. La neuroinvasione a partire dal GIT può avvenire anche senza il coinvolgimento del midollo spinale. In questo caso l'agente prionico diffonde lungo le fibre del nervo vago fino a raggiungere il NMDV, situato a livello di midollo allungato [35, 318]. La modalità di trasporto più probabile attraverso la quale i prioni raggiungerebbero il SNC sarebbe quella assonale, la quale prevede una progressiva pinocitosi degli stessi da parte della rete dendritica neuronale ed il loro trasporto retrogrado verso il pirenoforo [163, 182, 184]. L'agente della Scrapie proseguirebbe il suo "viaggio", quindi, raggiungendo l'*obex*, per poi diffondersi al cervelletto, al diencefalo e alla corteccia frontale attraverso la porzione rostrale del midollo allungato.

Questa ordinata progressività non risulterebbe essere casuale, tanto che è stata classificata da Wemheuer *et al.* (2011) nei seguenti 4 stadi:

1. stadio di ingresso nel SNC, con colonizzazione e accumulo della PrP^{Sc} a livello di NMDV, nucleo del tratto solitario e nucleo del tratto spinale del trigemino;
2. stadio di colonizzazione del midollo allungato, con accumulo di PrP^{Sc} a livello dei nuclei dell'*obex* e nelle porzioni più rostrali del midollo allungato;
3. stadio di colonizzazione del *sulcus cruciatus*, con accumulo di 7PrP^{Sc} a livello di mesencefalo, nuclei amigdaloidi, nuclei settali, tratto ottico, peduncolo cerebrale, ippocampo, cortaccia frontale e sostanza bianca subcorticale;
4. stadio di colonizzazione dei gangli della base, con accumulo della PrP^{Sc} a livello di nuclei talamici mediali, corpo genicolato e gangli della base. Alcuni depositi sarebbero talvolta rilevabili anche nella sostanza bianca;
5. la figura 5 riassume schematicamente il complesso *iter* che caratterizza la cinetica di neuroinvasione.

L'infettività nel sangue

Un altro importante quesito che riguarda la patogenesi delle TSE e che ha costituito altresì un ulteriore motivo di preoccupazione per molto tempo sarebbe quello relativo alla presenza di infettività prionica nel sangue. Inizialmente, la presenza di infettività nel sangue è dimostrata in corso sia di Scrapie ovina che di vCJD [226]. Numerosi studi hanno già dimostrato che la via ematogena potrebbe costituire un importante veicolo di diffusione degli agenti patogeni, cosa che sarebbe particolarmente importante per il prione responsabile della Scrapie. È stato proposto, nella fattispecie che la prionemia possa avvenire in due fasi: una prima fase immediatamente successiva alla captazione cellulo-mediata dei prioni dal lume intestinale nel sistema linfatico, seguita da una seconda fase conseguente alla replicazione prionica all'interno del LRS [432]. A tale proposito, era già stato documentato in precedenza che in corso di Scrapie murina la PrP^{Sc} risulterebbe associata ai leucociti della componente plasmatica [342], mentre la stessa si troverebbe associata alla frazione leucocitaria del sangue in corso di Scrapie ovina [453].

Durante la Scrapie, i leucociti possono rivestire un ruolo importante nella diffusione prionica in quanto essi possono circolare nell'ambito del LRS e dei relativi tessuti linfatici. Inoltre, le cellule mononucleate del sangue periferico (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMC) esprimerebbero costantemente la PrP^C sulla loro superficie [28, 185, 205], elemento quest'ultimo che costituirebbe un prerequisito fondamentale al fine dello sviluppo delle infezioni da prioni [62, 67, 230]. I linfociti CD4⁺ dell'ovino esprimono livelli relativamente bassi di PrP^C sulla loro superficie [389], mentre i linfociti CD21⁺ presenterebbero livelli di espressione più alta [185].

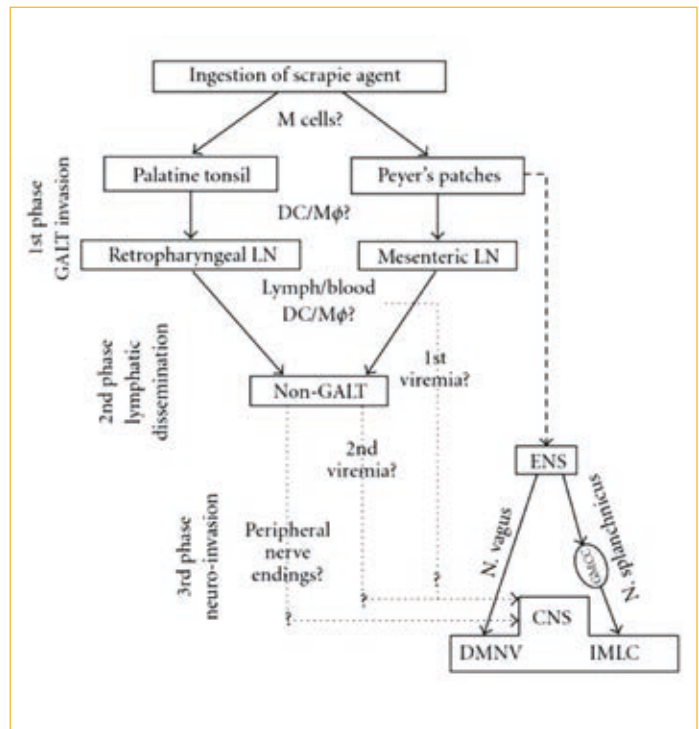


Figura 5. Rappresentazione schematica del processo di neuroinvasione compiuto dall'agente prionico. 1) Prima fase: invasione del GALT; 2) Seconda fase: disseminazione linfo-ematogena; 3) Terza fase: Neuroinvasione [da Sisò *et al.*, 2010, modificato].

Alcuni Autori hanno inoltre valutato la capacità di diverse popolazioni leucocitarie del sangue di ovini Scrapie-infetti nel captare e accumulare la PrP^{Sc}. Essa risulterebbe associata anche a cellule che esprimono antigeni del complesso MHC di classe II nel sangue sia di ovini affetti da Scrapie naturale e sperimentale, sia di ovini BSE-infetti, durante le fasi pre-cliniche e cliniche dell'infezione. In un altro lavoro gli stessi Autori hanno dimostrato che le cellule B o una loro sottopopolazione concentrerebbero la PrP^{Sc} nel sangue di ovini con genotipo ARQ/VRQ Scrapie-infetti [127]. Alcuni interessanti lavori, infine, hanno potuto dimostrare come anche l'età dell'ospite possa esercitare una significativa influenza sulla patogenesi e sulla suscettibilità alla malattia da prioni. I suddetti studi hanno messo in evidenza, infatti, come alcuni topi in età avanzata (≥ 600 giorni) infettati sperimentalmente per via endovenosa con l'agente della Scrapie non erano in grado di sviluppare i segni clinici della malattia, ma contemporaneamente presentavano lesioni evidenti a livello di SNC e contestuale accumulo di PrP^{Sc} a livello di SNC, rispetto ad animali giovani facenti parte dello stesso esperimento [59]. Questo studio suggerirebbe pertanto che, a causa di un alterato funzionamento della zona marginale spleno-follicolare conseguente alla senescenza, le FDCs non sarebbero in grado di captare efficacemente immunocomplessi, tantomeno agenti prionici sulla loro superficie.

Scrapie ovina: diagnosi di laboratorio

La diagnosi di laboratorio della Scrapie e di altre TSE umane e animali si basa sull'utilizzo di adeguate tecniche immunobiochimiche e immunoistochimiche il cui obiettivo finale è quello di dimostrare la presenza o meno della PrP^{Sc} all'interno dei tessuti [119].

La metodica di riferimento è rappresentata proprio dall'immunoistochimica, che ad oggi rappresenta il *golden standard*. Quest'ultima risulta essere una metodica di carattere qualitativo attraverso la quale è possibile dimostrare, con ragionevole certezza, la presenza/assenza della PrP^{Sc} in sezioni ottenute da tessuti precedentemente fissati in formalina ed inclusi in paraffina, oppure su sezioni tissutali allestite al criostato.

Il principio su cui si basa questa tecnica è quello di sfruttare l'affinità di anticorpi monoclonali o policlonali nei confronti della PrP, valutando la conseguente reazione antigene-anticorpo mediante opportune metodiche di "rivelazione".

I test rapidi

Le tecniche immunobiochimiche, quali *Western blotting* (WB) ed ELISA, sono alla base dei cosiddetti "test rapidi" e trovano largo impiego come *test di screening* nei piani di sorveglianza nazionale della Scrapie e della BSE. Tuttavia, in base alla vigente normativa, ogni eventuale positività ai test rapidi eventualmente riscontrata deve essere confermata mediante opportune indagini immunoistochimiche. Tali test diagnostici vengono realizzati su omogenati di tessuto cerebrale (tronco encefalico), a partire da materiale biologico fresco o congelato. Attualmente sono ammessi nei Paesi dell'Unione Europea test rapidi, *Prionics*, *Platelia*, *Enfer*.

Il test rapido *Platelia*

Si tratta di un ELISA *sandwich* il quale viene eseguito su piastre a 96 pozzetti. Anche in questo caso l'omogenato viene sottoposto ad un pre-trattamento con proteinasi K. La positività è svelata dallo sviluppo di una reazione colorimetrica.

Il test rapido *Enfer*

È un test ELISA. La metodica è molto simile a quella descritta per *Platelia*. In questo caso, però, il campione viene fatto reagire con anticorpi anti-PrP coniugati con un enzima che dà luogo ad una reazione di chemiluminescenza.

Il test rapido *Prionics*

Tale test prevede l'esecuzione di un WB su omogenati di tessuto cerebrale precedentemente digeriti con proteinasi K. La positività al test è data dalla comparsa delle caratteristiche 3 bande proteiche nelle quali si stratifica la PrP^{Sc} (foto 3 e 4). Il test *Prionics*, prodotto in Svizzera e ufficialmente utilizzato in Italia, rappresenta a decorrere del 2001 il principale test ufficiale su cui si basa, nell'intero territorio dell'UE, la sorveglianza

"attiva" nei confronti della BSE e a decorrere dal 2002, viene parimenti utilizzato nei confronti della Scrapie ovi-caprina.

Il prelievo dei campioni di tessuto cerebrale da destinare alle indagini diagnostiche deve essere effettuato previa disarticolazione della testa a livello dell'articolazione atlanto-occipitale. Quindi si dovrà procedere all'apertura della scatola cranica e alla successiva estrazione dell'encefalo "in toto" (animali sintomatici), oppure al prelievo del tronco encefalico mediante un apposito cucchiaino da inserire nel *foramen magnum* (animali sottoposti a sorveglianza attiva). Il tessuto cerebrale così prelevato deve essere inviato nel più breve tempo possibile al laboratorio dove verrà suddiviso longitudinalmente in due parti. Una parte sarà quindi congelata a -20 °C oppure a -80 °C, mentre l'altra verrà fissata in formalina neutra tamponata al 10% per le successive indagini istomorfologiche ed immunoistochimiche eventualmente necessarie. Un problema di notevole importanza inerente al prelievo dei tessuti è legato alla corretta conservazione di questi, al fine di poter ottenere risultati affidabili in sede di indagini laboratoristiche. Uno studio condotto da Huang et al. (2011) ha valutato gli effetti del diverso grado di autolisi dei campioni di tessuto cerebrale sulla rilevazione della PrP^{Sc}, riportando che dopo 15 giorni di autolisi post-mortale a 37 °C diminuirebbero visibilmente i livelli di PrP^{Sc} nel tessuto linfoide e nel SNC di animali infetti. La PrP^{Sc} residua verrebbe comunque svelata attraverso WB ed ELISA. Il problema eventualmente sorgerebbe qualora i depositi di PrP^{Sc} non dovessero essere uniformi e, soprattutto, qualora questi fossero di modesta entità. In questo caso la probabilità di ottenere risultati falsamente negativi sarebbe aumentata.

Un problema tecnico di fondo connesso all'utilizzo delle suddette metodiche diagnostiche, siano esse di tipo immunoistochimico che immunobiochimico, è quello legato all'identità di sequenza aminoacidica (struttura primaria) fra PrP^C e PrP^{Sc} cosa che rende assai complessa la produzione di anticorpi (monoclonali e policlonali) in grado di discriminare le due isoforme. Per ovviare a tale inconveniente, sono stati studiati diversi pre-trattamenti di tipo chimico-fisico (proteinasi K, acido formico al 96-98%, isotiocianato di guanidina, autolavaggio a 121 °C etc.) che, adeguatamente applicati – da soli o in associazione – riducono o eliminano la positività immunoistochimica nei confronti della PrP^C, esaltando al contempo quella della PrP^{Sc} [119].

La PrP^{Sc} può altresì essere dimostrata mediante l'impiego della microscopia elettronica a trasmissione a contrasto negativo su omogenati di tessuto cerebrale pretrattati con appositi detergenti, dove appare con l'aspetto delle caratteristiche fibrille note come SAF o *prionrods*.

I test diagnostici finora citati possono trovare applicazione non solo se eseguiti su campioni di tessuto cerebrale (*post-mortem*), ma anche nella diagnosi *ante-mortem* su tessuti prelevabili *intra vitam*, quali tonsille palatine, terza palpebra e RAMALT.

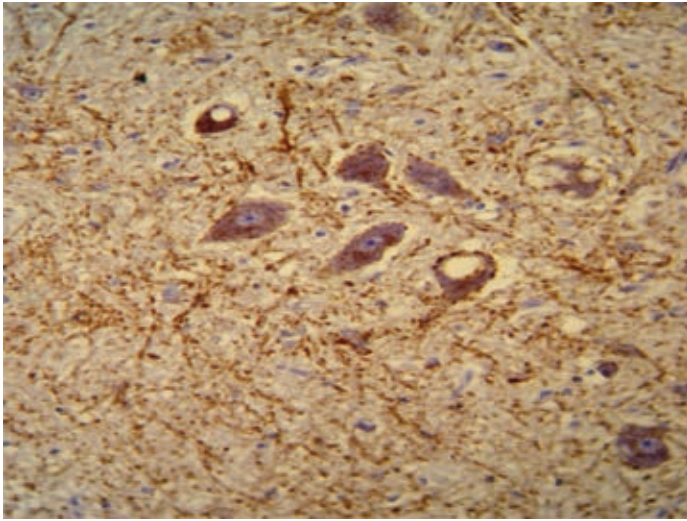


Foto 3. Ovino. Cervello. Scrapie. Intensa e diffusa deposizione di PrP^{Sc} a livello del NMDV. Colorazione di contrasto con ematossilina di Mayer, medio ingr.

Tuttavia, la diagnosi *intra vitam* delle TSE mediante l'utilizzo di tecniche immunoistochimiche ed immunobiochimiche non gode di un livello di "standardizzazione" e di "validazione" ufficiale in ambito internazionale, paragonabile a quello relativo all'applicazione delle medesime metodiche sul tessuto cerebrale [119, 172, 173, 353, 407].

La possibilità di una diagnosi *intra vitam*

Relativamente alla possibilità di una diagnosi *intra-vitam* delle TSE, sono state segnalati vari elementi, quali:

- dimostrazione di un legame selettivo della PrP^{Sc} (ma non della PrP^C) con il plasminogeno;
 - dimostrazione di una notevole riduzione dei livelli di espressione dell'EDRF (*Erythroid Differentiation-related Factor*);
 - dimostrazione della presenza, nelle urine, di uno specifico *marker* di infezione (UPrP^{Sc}), simile alla PrP^{Sc}, sebbene privo di potere infettante, la cui comparsa precederebbe di gran lunga, nel criceto, l'insorgenza dei segni clinici di malattia. Successive indagini spettrofotometriche hanno tuttavia permesso di definire la natura immunoglobulinica di tale composto, ascrivibile alla catena leggera delle immunoglobuline;
 - dimostrazione di un legame selettivo della PrP^{Sc} con le lipoproteine plasmatiche (VLDL e LDL, ma non HDL) nel tessuto cerebrale di pazienti umani affetti da vCJD.
- La presenza della PrP^{Sc} non è sempre facilmente dimostrabile

Il presente lavoro è stato estratto dalla tesi "Ricerca della PrP^{Sc} nelle ghiandole surrenali di ovini di razza Sarda infettati sperimentalmente con l'agente della Scrapie" del Dott. Domenico Sciota, relatore Prof. Giovanni Di Guardo, che ha vinto la VII edizione del concorso "Premio di laurea in Sanità pubblica veterinaria e Sicurezza alimentare – 2019" indetto dalla SIMeVeP. La versione integrale della tesi, completa di bibliografia, è disponibile sul sito della SIMeVeP all'indirizzo: https://www.veterinariapreventiva.it/esterne/sanita-animale-esterna/tesi_scrapie_ovini

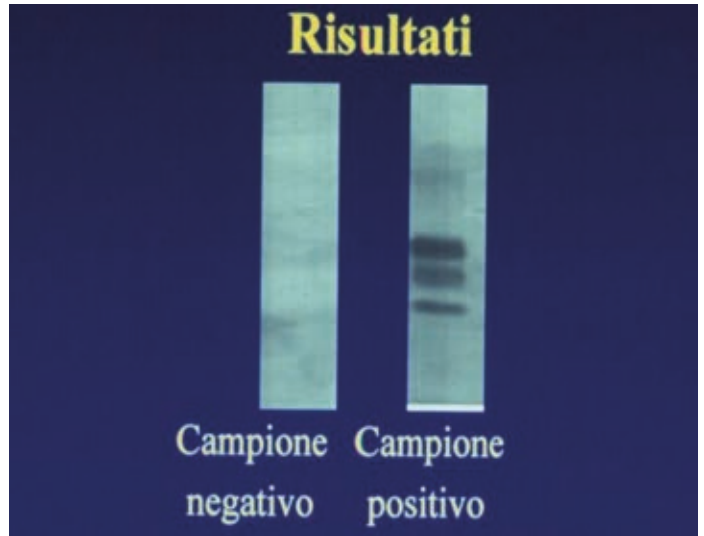


Foto 4. Bovino. BSE. Western Blotting (WB) su omogenato di tessuto cerebrale di un animale BSE-negativo (*lane 1*) e di un animale BSE-infetto (*lane 2*), in cui si possono notare le tre bande proteiche in cui si stratifica la PrP^{Sc}.

in corso di TSE, cosa che ha motivato la realizzazione di un protocollo di amplificazione *in vitro* della stessa del tutto simile alla PCR. La metodica in questione prende il nome di PMCA e, sebbene notevolmente perfezionata nel corso degli anni (anche ai fini della diagnosi preclinica), può generare risultati falsamente positivi in condizioni sperimentali non adeguatamente controllate [95, 119].

In campo umano, ai fini della diagnosi *intra vitam* delle TSE è stata proposta la ricerca nel liquido cefalo-rachidiano (LRC) delle proteine della famiglia 14-3-3 e anche la ricerca della PrP^{Sc} nel LCR di pazienti affetti da vCJD mediante una tecnica molto sensibile, denominata SIFT (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*). In campo veterinario la proteina 14-3-3 non mostra particolare utilità diagnostica nella Scrapie ovina in quanto sarebbe un *marker* diagnostico sensibile (95%), ma poco specifico (60%) [119]. Infine, in uno studio molto recente è stata valutata la possibilità di rilevare la PrP^{Sc} nel sangue intero di ovini Scrapie-infetti utilizzando un semplice saggio immunologico indipendente da proteinasi e denaturazione, basato sull'affinità competitiva di un anticorpo monoclonale specifico (15B3) e streptavidina nei confronti della PrP^{Sc}. Questi studi iniziali forniscono informazioni sullo sviluppo di un test di *screening* su larga scala per la diagnosi di *routine* della Scrapie ovina [435].