



## Breve excursus sulla Scrapie: la diagnosi - Brief on Scrapie: the diagnosis

*Biagetti M., Morelli A., Scoccia E., Maresca C.*

---

**Abstract.** The diagnosis of scrapie is performed post mortem. A clinical neurological examination identified the suspect animal showing abnormal behavior, such as: hyperexcitability, motor incoordination, skin lesions due to scratching and loss of the fleece. The laboratory diagnosis of scrapie is based on the demonstration of the presence of PrPsc in the CNS. For this purpose the rapid tests used for identification of PrPsc are: the Western immunoblot, the dosage for immunoluminescenza (LIA), the enzyme immunoassay (ELISA), along with histological examination, to show vacuolar morphological alterations and the immunohistochemical examination. In the case of classical scrapie, section of medulla oblongata taken at obex is considered the seat of election of the vacuolar morphological alteration, while in the case of atypical scrapie the most consistent lesions are identified at the level of the cerebellum, thalamus and basal ganglia

**Riassunto.** La diagnosi di scrapie viene effettuata post mortem. Un esame clinico-neurologico individua gli animali sospetti evidenziando disturbi del comportamento, ipereccitabilità, incoordinazione motoria, lesioni cutanee da grattamento e perdita del vello. La diagnosi di laboratorio della scrapie si basa sulla dimostrazione della presenza della PrPsc nel SNC. A tale scopo i test rapidi utilizzati per l'identificazione della PrPsc sono: il Western immunoblot, il dosaggio per immunoluminescenza (LIA), il dosaggio immunoenzimatico (ELISA), insieme all'esame istologico, per la dimostrazione delle alterazioni morfologiche vacuolari e l'esame immunostochimico. Nel caso di scrapie classica, la sezione di midollo allungato preso a livello dell'obex è considerata la sede di elezione dell'alterazione morfologica vacuolare, mentre nel caso di scrapie atipica le lesioni più consistenti sono individuate a livello del cervelletto, talamo e gangli basali

---

### Introduzione

La scrapie è una patologia neurodegenerativa ad esito letale inclusa nel gruppo delle encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) che colpisce le pecore e le capre. La malattia si trasmette prevalentemente per via orizzontale come conseguenza dell'introduzione nel gregge di soggetti infetti ma si trasmette anche per via verticale. Le lesioni del sistema nervoso centrale che caratterizzano tali patologie sono: spongiosi della sostanza grigia cerebrale; degenerazione e scomparsa dei neuroni; iperplasia e ipertrofia astrociataria; deposito della proteina prionica scrapie associata (PrPsc) intracellulare, in particolare endoneuronale. L'agente della scrapie persiste nell'ambiente molto tempo, le placente infette rappresentano una importante fonte di infezione. Il periodo di incubazione è lungo, il quadro clinico mostra alterazioni comportamentali e neurologiche. Della malattia si conosce una forma classica e una atipica, le due forme si differenziano per le manifestazioni cliniche, per la localizzazione delle lesioni istopatologiche e per i fattori genetici coinvolti nel modulare la suscettibilità o la resistenza alla malattia.

### **Diagnosi di laboratorio.**

Ai fini della diagnosi, un primo orientamento è fornito da un esame clinico-neurologico che evidenzia disturbi comportamentali, sensitivi, motori e del sistema nervoso autonomo progressivi, spesso conseguenti all'introduzione nel gregge di nuovi capi infetti. La presenza di lesioni cutanee da grattamento o mordicchiamento e la perdita del vello si possono notare all'esame ispettivo del cadavere, al contrario delle lesioni macroscopiche del SNC; la diagnosi definitiva prevede il riscontro cerebrale dell'isoforma patologica della PrPc (Marcato P. S., 2008).

In accordo con l'ipotesi del prione, la dimostrazione della PrPsc coincide con l'identificazione dell'agente eziologico; per tale identificazione si può ricorrere all'inoculazione di materiale proveniente da tessuti infetti in roditori da laboratorio. E' importante anche la caratterizzazione biologica del ceppo, sia per la definizione di alcune varianti fenotipiche emergenti sia per un approccio discriminante che distingua i casi di scrapie da quelli di BSE nelle pecore e nelle capre (OIE terrestrial manual, 2009).

Data l'assenza di evidenti alterazioni patologiche, la diagnosi di laboratorio per la scrapie si basa sulla dimostrazione delle alterazioni istopatologiche, insieme al rilevamento immunoistochimico di PrPsc nel SNC. Con l'esame istopatologico si rilevano le alterazioni morfologiche del SNC, principalmente la vacuolizzazione dei corpi cellulari neuronali e del circostante neuropilo, accompagnate da una variabile e frequente gliosi. Tali lesioni presentano una distribuzione simmetrica e sono collocate per lo più a livello del tronco encefalico e del nucleo dorsale del vago nel caso della scrapie classica (Figura 1 e 2).

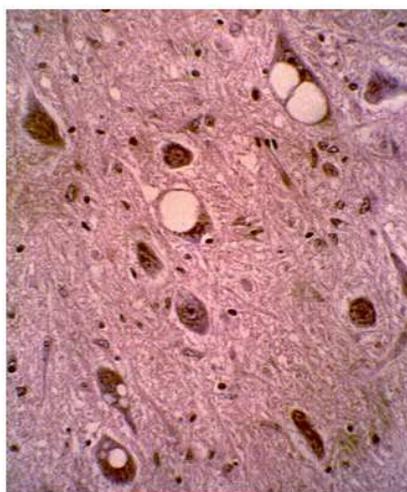


Figura 1. Esame istologico colorato con ematossilina-eosina che mette in evidenza lesioni spongiformi su obex ovino (Fonte: IZSUM, 2012).

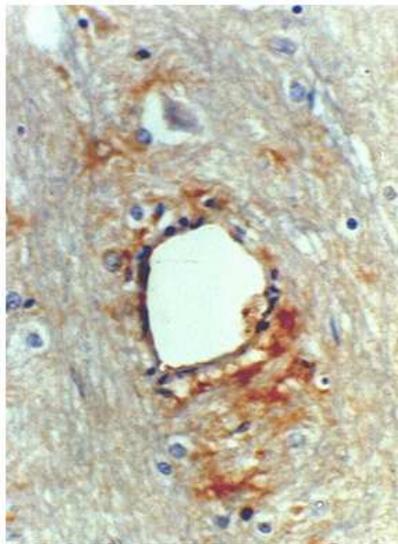


Figura 2. Esame immunohistochimico. Si evidenziano depositi di sostanza amiloide su obex ovino (Fonte: IZSUM 2012).

In corso di scrapie classica, è possibile esaminare non solo il sistema nervoso centrale degli animali morti, ma si può individuare la presenza di PrP<sup>Sc</sup> nel tessuto linforeticolare di questi attraverso l'esame bioptico delle tonsille palatine, della membrana nittitante e dei linfonodi superficiali. La presenza di PrP<sup>Sc</sup> nei tessuti linforeticolari è influenzata dal genotipo di appartenenza dell'ospite e non riguarda pecore o capre con scrapie atipica. Il test sul tessuto linforeticolare offre la possibilità di trovare animali infetti con scrapie classica in periodi d'incubazione relativamente precoci, prima che il SNC risulti coinvolto; tuttavia il riscontro di PrP<sup>Sc</sup> al livello linfatico non ha la stessa validità del riscontro su tessuto cerebrale (Marcato P.S., 2008) (Figura 3).



Figura 3. Immunohistochimica di tonsilla proveniente da ovino affetto da scrapie (Fonte: IZSUM, 2012).

La diagnosi di scrapie storicamente si basa sull'esame di una singola sezione di midollo allungato preso a livello dell'obex, considerato la sede d'elezione dell'alterazione morfologica vacuolare, tale approccio è ancora valido per la conferma di scrapie classica, ma non per la atipica. In corso di scrapie atipica il midollo allungato mostra minime alterazioni, mentre le lesioni più consistenti sono individuate a livello del cervelletto, talamo e gangli basali (OIE Terrestrial Manual 2009; Wemheuer et al., 2011; Mazza et al., 2010).

L'asportazione del tronco encefalico deve avvenire attraverso il foramen magnum, a livello dell'obex, invece per la diagnosi di scrapie atipica, l'asportazione deve comprendere anche il cervelletto (Figura 4).



Figura 4. Asportazione del tronco encefalico attraverso il foramen magnum (Fonte: IZSUM, 2012).

Il tronco encefalico si seziona sul piano mediano, una metà si fissa in formalina per la diagnosi istopatologica, mentre l'altra metà si utilizza per il prelievo del campione da analizzare tramite test rapidi (Seuberlich et al., 2010), (Figura 5).



Figura 5. Sezione del tronco encefalico sul piano mediano per l'esecuzione dei test rapidi (Fonte: IZSUM, 2012).

Esistono dei test rapidi in commercio per l'identificazione della PrPsc, introdotti originariamente per la diagnosi di BSE, poi approvati per la diagnosi di scrapie. Questi test rapidi sono il Western immunoblot, il dosaggio per immunoluminescenza (LIA), il dosaggio immunoenzimatico (ELISA). I risultati positivi o dubbi ottenuti sono confermati con l'esame istologico, l'immunoistochimica e il Western blot. Queste metodiche sono in grado di evidenziare la scrapie classica, la BSE e alcune successivamente hanno dimostrato di essere in grado di rilevare anche la scrapie atipica, anche se in misura diversa.

L'identificazione della PrPsc si basa su una sua caratteristica di essere solo parzialmente digerita dalla proteinasi k; proteinasi che invece, è in grado di digerire totalmente tutte le altre proteine. Successivamente le proteine si sottopongono a corsa elettroforetica e la PrPsc si evidenzia in chemiluminescenza utilizzando specifici anticorpi (Figure 6 e 7).

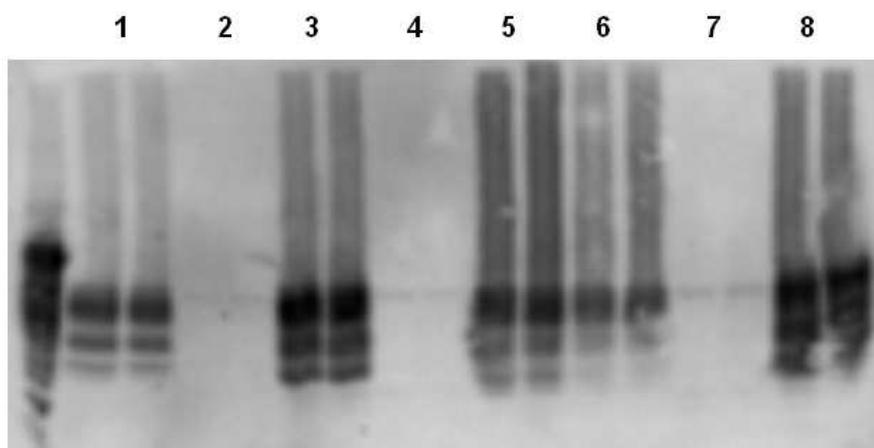


Figura 6. Tracciato elettroforetico di obex che mostra le caratteristiche

delle bande presenti in corso di BSE bovina, scrapie classica  
e Bse negli ovi-caprini (Fonte: IZSUM, 2012).

In 1 si notano le bande caratteristiche di obex di bovino BSE positivo, in 3 e 8 bande di obex ovi-caprino positivo alla scrapie classica, in 5 e 6 bande di obex ovi-caprino positivo a BSE, mentre 2, 4 e 7 sono negativi.

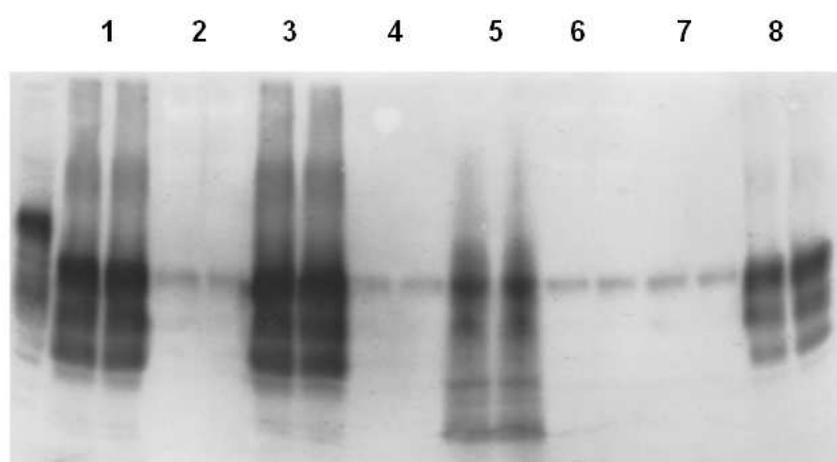


Figura 7. Tracciato elettroforetico di obex (Fonte: IZSUM, 2012).

Si fa notare che i tracciati in 2, 4, 6 e 7 appartengono all'obex di animali negativi alla scrapie; mentre 1, 3 e 8 sono i tracciati elettroforetici positivi alla scrapie classica ed infine il 5 è il tracciato elettroforetico di un animale positivo alla scrapie atipica .

Sono molti i test rapidi usati per la diagnosi della scrapie fino ad oggi, inizialmente si utilizzava il Prionics Check Western-Blot in cui l'omogenato, preparato a partire dall'obex, viene trattato con proteinasi k, le proteine ottenute vengono sottoposte a corsa elettroforetica e la PrPsc si evidenzia in chemiluminescenza con l'aggiunta di un anticorpo coniugato con la fosfatasi alcalina a cui va aggiunto il relativo substrato (CDP Star).

Successivamente è stato introdotto il test Biorad TeSee che prevede: l'omogeneizzazione, la digestione con proteina k, la concentrazione e la rivelazione immunologica della proteina prionica su piastra con lettura spettrofotometrica. In seguito si è specificatamente indicato il TeSee Sheep Goat per il rilevamento della scrapie in ovini e caprini; il test si basa sullo stesso principio del Biorad tesse test, ma utilizza diversi anticorpi monoclonali.

Il successivo Enfer mette in evidenza la PrPsc tramite: un anticorpo primario policlonale, uno secondario coniugato ad una perossidasi e un derivato del luminolo.

Insieme al precedente viene introdotto il Prionics-Check LIA small ruminants che previa omogeneizzazione, digestione e incubazione con un anticorpo primario, rivela la PrPsc con un anticorpo secondario coniugato ad un enzima in grado di generare un segnale luminoso in seguito all'aggiunta di un substrato luminescente da rilevare con il luminometro.

Nel 2010 in Italia si introduce il Prionics Check Western Blot per la diagnosi, ora oltre al Prionics Check Western Blot e al Biorad TeSee, il test rapido maggiormente usato sia per la diagnosi di scrapie che per la BSE è l'Idexx Herd Check.

L'Idexx Herd Check utilizza un polimero chimico per la cattura della PrPsc e un anticorpo monoclonale di rivelazione diretto contro le regioni conservate della PrP, per cui a differenza degli altri non prevede la digestione con la proteinasi k. L'EFSA[1], l'European Food Safety Authority, sconsiglia l'utilizzo di Enfer, Prionics check LIA, Prionics Check Western Blot per problemi di sensibilità e per la possibilità di non riconoscere la scrapie atipica (Figura 8).



Figura 8. Test rapidi usati nella diagnosi della scrapie, in (A) Biorad, in (B) Idexx maggiormente usato e consigliato dall'EFSA (Fonte: IZSUM).

E' molto importante identificare l'agente eziologico in corso di EST nei piccoli ruminanti per differenziarlo dalla BSE, dal momento che in questi animali le due patologie sono indistinguibili e per riconoscere l'eventuale presenza di forme atipiche. Nel momento in cui si sospetta la presenza della scrapie in un allevamento, si ricorre all'abbattimento dei capi e alla rimozione dell'obex attraverso procedure necroscopiche standard, subito dopo la morte dell'animale. E' importante eseguire ulteriori esami per identificare le diverse possibili EST e per la diagnosi differenziale con altre patologie che coinvolgono il SNC non EST; ricordando che la stessa area non può essere utilizzata per più approcci diagnostici.

Non c'è relazione diretta tra la gravità della sintomatologia clinica e le alterazioni patologiche, così una diagnosi clinica di sospetto di scrapie non può essere invalidata dall'impossibilità di trovare significative alterazioni nel SNC.

Infatti l'assenza di lesioni non indica l'assenza della scrapie, quindi la malattia può presentarsi senza segni clinici o alterazioni morfologiche rilevabili. Così l'esame del midollo allungato a livello dell'obex è basilare per la diagnosi di sospetto di scrapie classica, tuttavia per poter confermare la diagnosi di scrapie atipica è necessario analizzare anche il cervelletto.

Nei programmi di sorveglianza attiva la prima diagnosi si basa sull'utilizzo di un test rapido, nel caso di positività o risultato dubbio si procede alla conferma della diagnosi, dimostrando la presenza dell'isoforma patologica di PrP con l'istopatologia, l'immunoistochimica e il Western-Blot. Quest'ultimo è particolarmente consigliato quando le lesioni istologiche non sono molto gravi e possono essere considerate dubbie. Altre tecniche diagnostiche, quali le prove sierologiche, non possono essere attuate poiché non sono in grado di isolare l'agente eziologico della scrapie; anche se, nella diagnosi intra-vitam in ambito preclinico, si può notare il legame specifico di PrPsc con il plasminogeno e la presenza a livello urinario di un marker diagnostico d'infezione forse privo di potere infettante (Marcato P.S., 2008).

Sono importanti anche i mezzi diagnostici che permettono un controllo genetico di resistenza alla scrapie, quali PCR-Real Time e le tecniche di primer extension, dal momento che le strategie di controllo ed eliminazione si basano sulla selezione di un genoma con ridotto rischio di sviluppare la malattia (OIE terrestrial manual, 2009).

## **Bibliografia**

Marcato P.S., (2008). Patologia sistematica veterinaria. Edagricole, Milano, 1302-1309.

Mazza M., Iulini B., Vaccari G., Acutis P.L., Martucci F., Esposito E., Peletto S., Barocci S., Chiappini B., Corona C., Barbieri I., Caramelli M., Agrimi U., Casalone C., Nonno R. (2009). Co-existence of classical scrapie and Nor98 in a sheep from an Italian outbreak. *Research in veterinary science*, Jun. 88;(3):478-85.

OIE terrestrial manual, (2009). Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals 2009.

Seuberlich T., Heim D., Zurbriggen A. (2010). Atypical transmissible spongiform encephalopathies in ruminants: a challenge for disease surveillance and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* Nov. 22(6):823-42.

## Note

[1] EUROPEAN FOOD SAFETY (EFSA) ha il compito di fornire consulenza scientifica ai responsabili della gestione del rischio su tutti gli aspetti della BSE/TSE collegati alla salute animale e alla salute pubblica. La Commissione europea, nel quadro del Piano per le EST, formula richieste all'EFSA circa l'elaborazione di pareri scientifici che sono la base di discussione, con le altre istituzioni comunitarie, gli Stati membri e le parti interessate, delle misure da adottare nell'Unione Europea in relazione alla BSE/EST e per proporre o modificare la normativa, al fine di mantenere un elevato livello di protezione dei consumatori europei. Il gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici dell'EFSA gestisce questo lavoro avvalendosi della consulenza dei maggiori esperti ed elabora protocolli di valutazione dei nuovi test rapidi per le TSE, Test ante e post-mortem. nel quadro del Piano per le EST, formula richiesta all'EFSA circa l'elaborazione di pareri scientifici che sono la base di discussione, con le altre istituzioni comunitarie, gli Stati membri e le parti interessate, delle misure da adottare nell'Unione Europea in relazione alla BSE/EST e per proporre o modificare la normativa, al fine di mantenere un elevato livello di protezione dei consumatori europei. Il gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici dell'EFSA gestisce questo lavoro avvalendosi della consulenza dei maggiori esperti ed elabora protocolli di valutazione dei nuovi test rapidi per le TSE, Test ante e post-mortem.

[2] Il lavoro è stato tratto dalla Tesi di Laurea di Alessandra Morelli: *“Distribuzione della Scrapie nel tempo e nello spazio: analisi dei dati di sorveglianza nel mondo, in Italia ed in Umbria dal 2002 al 2011”*. Corso di Laurea in Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia (2012).

[3] I marchi BioRad® e IDEXX® sono proprietà delle rispettive case produttrici. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche non ha alcun rapporto di cointeressenza con le ditte citate.



Breve excursus sulla Scrapie: la diagnosi by Biagetti M., et al. 2013 is licensed under a Creative Commons Attribution - Non commerciale 3.0 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	<b>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy</b>	
<b>Centralino Istituto</b>	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047	
<b>Biblioteca</b>	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: <a href="mailto:bie@izsum.it">bie@izsum.it</a>	
<b>Rivista SPVet.it</b> ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: <a href="mailto:editoria@izsum.it">editoria@izsum.it</a> ; <a href="mailto:redazione-spvet@izsum.it">redazione-spvet@izsum.it</a> <a href="http://spvet.it">http://spvet.it</a> ; <a href="http://indice.spvet.it">http://indice.spvet.it</a>	
<b>U. R. P.</b>	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: <a href="mailto:URP@izsum.it">URP@izsum.it</a>	

