FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA - BRESCIA
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

# LE IMMUNODEFICIENZE DA RETROVIRUS E LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI

## Interrelazioni tra medicina umana e medicina veterinaria

a cura di Giorgio Poli, Luigi Bonizzi e Gianluigi Gualandi

Atti del Convegno di Milano, 8 Giugno 1990 -
Facoltà di Medicina Veterinaria

28

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

Atti del Convegno di Milano, 8 Giugno 1990

# LE IMMUNODEFICIENZE DA RETROVIRUS E LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
13 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
14 - 1985 5° Simposio Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino.
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986.
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
SCUOLA PER LA RICERCA SCIENTIFICA - BRESCIA
ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA

# LE IMMUNODEFICIENZE DA RETROVIRUS E LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI

## Interrelazioni tra medicina umana e medicina veterinaria

a cura di Giorgio Poli, Luigi Bonizzi e Gianluigi Gualandi

Atti del Convegno di Milano, 8 Giugno 1990

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via A. Bianchi, 1 - 25125 Brescia

Traduzione dei testi inglesi: Dott.ssa P. Dall'Ara, Dott. E. Peri, Prof. G. Poli
Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria
Università degli Studi - Milano

Revisione: Dott.ssa A. Ceccarelli e Dott.ssa A. Cocilovo
Istituto di Microbiologia e Immunologia Veterinaria
Università degli Studi - Milano

© 1990 - Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, Novembre 1990
Tipolitografia La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia

**PRESIDENTE ONORARIO**
- On. Francesco De Lorenzo

**OSPITE D'ONORE**
- Prof. Carleton D. Gajdusek (Nobel per la Medicina)

**COMITATO SCIENTIFICO**
- Prof. Gianluigi Gualandi
- Prof. Giorgio Poli
- Dott. Luigi Bonizzi

**SEGRETERIA ORGANIZZATIVA**
- Dott. Anna Ceccarelli
- Dott. Elena Rocchegiani
- Dott. Daniela Gelmetti

*Benvenuto*
Prof. Giuseppe Rognoni
*Preside della Facoltà di Medicina Veterinaria*

Prof. Paolo Mantegazza
*Magnifico Rettore dell'Università di Milano*

*Saluto*
Dott. Angelo Pecorelli
*Segretario Generale Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche*

Prof. Gianfranco Panina
*Direttore Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia*

Prof. Alberto Albertini
*Presidente Comitato Progetto Finalizzato "Biotecnologia e Biostrumentazioni" del CNR*

# INDICE

G. Poli, L. Bonizzi, G. Gualandi
Presentazione 11

H. Lutz
Il virus della leucemia felina (FeLV) e il virus dell'immundeficienza felina (FIV): agenti immunosoppressivi nel gatto 15

G. Achilli, E. Cattaneo
Diagnosi di infezione da HIV-1 33

G. Filici, P. Orsolini, L. Soldini, E. Razzini, R. Gulminetti, P.M. Cereda
Suscettibilità dei monociti di coniglio CD4 negativi all'infezione da HIV 43

M. Bendinelli
Modelli murini di AIDS 51

R. Boldorini, S. Cristina, L. Vago, G. Costanzi
Aspetti della patologia comparata da *Lentivirinae*. Indicazione sulla patogenesi delle lesioni anatomiche in corso di infezione da HIV 71

H. Fraser
La *scrapie* e i suoi omologhi 95

G. Bugiani
Nosografia delle encefalopatie spongiose umane 107

D.C. Gajdusek
Gli agenti di *scrapie* - *kuru* - BSE, quali polipeptidi infettanti: ipotesi della loro sintesi *"de novo"* da un normale precursore proteico dell'ospite 117

M. Pocchiari
Rischio di trasmissione e possibile prevenzione delle encefalopatie spongiose subacute 127

C.L. Bolis, G.J. Gibbs
Encefalopatia spongiforme bovina (BSE) 149

G. Fiore
Encefalopatia spongiforme del bovino (BSE): decisioni in ambito CEE 155

ATTI DEL CONVEGNO INTERNAZIONALE SU:

# "LE IMMUNODEFICIENZE DA RETROVIRUS E LE ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI"

## INTERRELAZIONI TRA MEDICINA UMANA E MEDICINA VETERINARIA

Milano 8 Giugno 1990
Facoltà di Medicina Veterinaria

**Moderatori:**

Prof. Elio Guido Rondanelli
Prof. Giorgio Poli
Prof. Franco Guarda
Prof. Giorgio Macchi

# PRESENTAZIONE

Cento anni or sono, microbiologi quali Löffler, Frosch, Iwanowsky e Beijerinck denominavano gli agenti dell'afta epizootica e del mosaico del tabacco, invisibili con i microscopi del tempo e pertanto del tutto sconosciuti, con il termine *contagium vivum fluidum*.

Con questa definizione intendevano cioè indicare agenti infettivi capaci di riprodursi, e di conseguenza viventi, ma che essendo filtrabili dovevano trovarsi in uno stato di dispersione diverso dagli altri microrganismi (batteri e funghi) allora conosciuti.

Anche oggi gli infettivologi sono costretti a ricorrere a terminologie parimenti "fantasiose" quando devono definire e quindi denominare quegli agenti patogeni che causano le *encefalopatie spongiose subacute*, inevitabilmente letali per l'uomo (es., il *kuru* e la malattia di *Creutzfeldt-Jakob*) e per gli animali (es., la *scrapie* e l'encefalopatia spongiforme del bovino).

E così, alle soglie del 2000, per indicare gli agenti responsabili di tali malattie vengono proposte definizioni come "*particelle infettanti di natura proteica*" (Prioni), oppure "*Virini*" in quanto sono attualmente ancora "invisibili" e chimicamente non definiti; e ciononostante la moderna tecnologia metta a disposizione strumenti come il microscopio elettronico ad "effetto tunnel", capace di rendere visibili le strutture biologiche, anche a livello atomico.

Accanto a questi agenti patogeni insoliti e quindi "non convenzionali", che preoccupano sempre più il mondo medico-veterinario, anche per la loro stupefacente capacità di resistere alla classica sterilizzazione in autoclave e alla formalina, hanno ancora maggiore rilevanza quegli agenti patogeni "convenzionali", classificati co-

me *retrovirus delle immunodeficienze acquisite*, dell'uomo e degli animali.

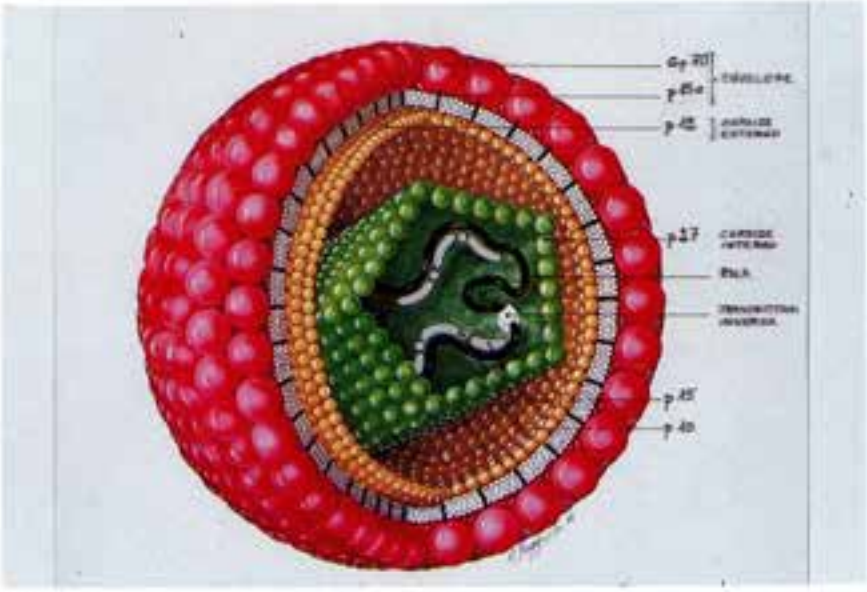
Anche nei riguardi di questi patogeni, pur ben caratterizzati a livello di struttura e composizione chimica, molti restano i quesiti insoluti o da chiarire, con riferimento, ad esempio, alla loro genesi, alle loro interrelazioni, ai meccanismi patogenetici e, soprattutto, alla prevenzione e terapia delle malattie di cui sono causa.

Sulla base delle attuali conoscenze si ritiene comunque che entrambe le problematiche sopra menzionate potranno trovare l'eventuale soluzione solo se vi sarà una interazione coordinata delle ricerche della medicina umana con quelle della medicina veterinaria.

Per quanto detto, emerge l'attualità del Convegno, i cui obiettivi sono sia di sancire l'importanza della interrelazione tra le due medicine, sia di individuare precisi programmi di ricerca comparata.

G. Poli, L. Bonizzi, G. Gualandi

# IMMUNODEFICIENZE DA RETROVIRUS



*Morfologia e struttura di un retrovirus prototipo.*
La molecola indicata con "P 15 e" è responsabile dell'effetto immunosoppressivo nell'ospite infetto. (Da: G. Poli, Università di Milano).

*Cercopiteco del genere "Macaca".*
Rappresenta il modello sperimentale più idoneo per la sperimentazione di farmaci e vaccini per l'AIDS. (Da: G. Biberfeld e B.M. Svensson, Università di Stoccolma, Svezia).

*Gatto colpito da FIV (Feline Immunodeficiency Virus).*
Microrganismi opportunisti hanno causato un'infezione cronica dell'apparato respiratorio. (Da: N.C. Pedersen, Università di Davis, California).

*Sezione di milza di gatto con infezione naturale da FIV.*
È evidente la notevole iperplasia delle aree follicolari e paracorticali. (Da: V. Dieth e H. Lutz, di Zurigo, Svizzera).

H. LUTZ

# IL VIRUS DELLA LEUCEMIA FELINA (FeLV) E IL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA (FIV): AGENTI IMMUNOSOPPRESSIVI NEL GATTO[1]

Dept. of Medicine, School of Veterinary Medicine,
Winterthurestrasse 260, University of Zurich, 8057 Zurich (Switzerland)

## ONCOVIRUS

### *Virus della leucemia felina (FeLV)*

Venticinque anni fa, Jarrett e coll. identificarono il primo retrovirus felino, il FeLV (Jarrett *et al.*, 1964). Da allora, rappresentanti di tutte e 3 le sottofamiglie dei retrovirus sono stati identificati nel gatto. I punti di contatto fra l'appena scoperto FeLV e gli altri oncovirus murino e aviare furono immediatamente evidenti. Dal momento che i gatti, contrariamente ai topi e agli uccelli domestici, sono generalmente animali *outbred* l'infezione indotta da FeLV è stata considerata un modello ideale per lo studio della patogenesi dei tumori nell'uomo. Per questo motivo, il primo grande interesse della ricerca sul FeLV si è concentrato sugli aspetti oncogeni dell'infezione da FeLV. Solo alcuni anni più tardi, dopo che fu disponibile un *test* di immunofluorescenza indiretta (IFA) per la diagnosi di FeLV, divenne chiaro che questo virus non è solamente responsabile di forme linfosarcomatose e mieloproliferative, ma anche di numerose altre condizioni patologiche come anemia, immunosoppressione e disturbi neurologici. Sulla scia delle prime ricerche sul FeLV, due altri oncovirus furono scoperti: il *feline sarcoma virus* (FeSV) (Snyder e Theilen, 1969) e l'*RD 114-virus* (McAllister *et al.*, 1972). Il FeLV è probabilmente evoluto da un virus leucemico del topo e del ratto e ha superato le barriere di specie grazie alla caccia a questi animali esercitata dai gatti.

[1] Comunicazione in pubblicazione, in inglese, su *Veterinary Microbiology* (1990), col titolo "Feline Retrovirus: a Brief Review".

I virioni del FeLV sono particelle sferiche che contengono due molecole di RNA a singolo filamento, a polarità positiva. Il genoma comprende 3 geni, il *gag* che codifica per gli antigeni gruppo-specifici, il *pol* che codifica per la polimerasi (trascrittasi inversa) e l'*env* per i costituenti dell'*envelope*. Il *core* dei virioni del FeLV è composto da proteine (p10, p12, p15, p27), codificate dal gene *gag*, e dalla trascrittasi inversa. L'*envelope*, di natura lipoproteica, è costituito da una proteina transmembrana p15 (E) altamente idrofobica, e da una glicoproteina gp70 attaccata alla p15 (E) da ponti disolfuro.

La replicazione di un oncovirus consta dei seguenti passaggi. Dopo l'adsorbimento e l'entrata del virus nella cellula ospite, la trascrittasi inversa dapprima catalizza la sintesi di una molecola a singolo filamento, quindi, dopo la digestione dell'RNA virale, di una molecola di DNA a doppio filamento. Il DNA a doppio filamento è poi trasferito nel nucleo dove viene integrato, grazie a un legame covalente, nel DNA cromosomiale. Dopo la trascrizione, l'mRNA viene tradotto in grandi poliproteine che successivamente, appena prima dell'assemblaggio del virus, sono scisse in proteine virali mature. Dopo che l'RNA virale è stato incorporato nel *core*, il virione lascia la cellula per gemmazione.

Normalmente, le cellule infettate non vengono distrutte durante la replicazione del virus.

Tre sottotipi di FeLV sono stati distinti, ma non sierologicamente, in base alle prove condotte *in vitro* sul tropismo d'ospite. Mentre non si può associare un chiaro potenziale patogeno a ciascun sottotipo, alcuni isolati mostrano considerevoli differenze di patogenicità (Tab. 1).

Il FeLV è trasmesso principalmente per via orizzontale attraverso la saliva ed altre secrezioni (Hardy, 1980). L'incidenza dell'infezione è alta quando i gatti sono tenuti in condizioni di sovraffollamento: in tali situazioni la percentuale di animali infetti ed eliminatori di virus può essere del 30% o più. Dei gatti tenuti individualmente, anche se hanno la possibilità di andar fuori, solo una piccola percentuale elimina il virus. In Europa, una percentuale fra il 3 e il 10% di tutti i gatti è infetta da FeLV (Weijer e Daams, 1976). I gatti giovani sono molto suscettibili all'infezione da FeLV, men-

tre gli adulti sono generalmente abbastanza resistenti.

Tuttavia, anche i gatti vecchi sono spesso infettati quando la pressione dell'infezione è alta e continua.

Rojko e coll. hanno studiato la patogenesi dell'infezione del FeLV: dopo l'entrata attraverso la cavità orale o nasale, il virus si replica in primo luogo nei tessuti linfoidi di queste strutture. Da qui si diffonde, trasportato da cellule linfoidi, al midollo osseo. Quando le cellule del midollo sono infettate, si ha la viremia che consente il raggiungimento di tutti i distretti organici, in particolare la milza, i linfonodi, l'intestino, la vescica e le ghiandole salivari, dalle quali il virus è eliminato in alte concentrazioni. Quando i neutrofili infetti e le piastrine abbandonano il midollo osseo ed entrano nella corrente ematica, possono essere facilmente evidenziati in strisci di sangue con l'IFA utilizzando antisieri specifici per gli antigeni gruppo-specifici del FeLV. Questa tecnica, introdotta per la prima volta da Hardy e coll., si è dimostrata utilizzabile routinariamente per la diagnosi di infezione da FeLV. Un risultato positivo in IFA è considerato probante per la diagnosi di viremia. Tuttavia, non tutti i gatti infetti sono svelati dall'IFA. Una tecnica più nuova e più sensibile per la diagnosi dell'infezione da FeLV è l'ELISA che utilizza anticorpi monoclonali verso la proteina maggiore del *core* del FeLV (Lutz *et al.*, 1983a). Dal momento che questi anticorpi riconoscono degli epitopi distinti, il *test* potrebbe essere usato come una ELISA "*one-step*" (Lutz *et al.*, 1983b). Con questa ELISA è possibile svelare la p27 del FeLV non solo nel siero o plasma, ma anche nella saliva dei gatti infetti (Lutz e Jarrett, 1987).

Quando l'evoluzione dell'infezione da FeLV è monitorata in gatti infettati in condizioni naturali, si possono osservare diverse reazioni dell'organismo. Un certo numero di soggetti presenterà una viremia persistente, come rivelato dai risultati positivi ottenuti in ELISA e in IFA, dopo svariate settimane dal contatto con un gatto portatore del FeLV. Altri gatti presenteranno una viremia transitoria della durata di alcuni giorni o settimane, dopo la quale svilupperanno una risposta immunitaria protettiva. Un terzo gruppo di animali non mostrerà mai segni rilevabili di viremia, ad es. in ELISA e in IFA non sono mai positivi. Sebbene in questo terzo gruppo di gatti nessun antigene virale possa essere svelato, essi potranno

andare incontro a sieroconversione e sviluppare alti titoli anticorpali (Lutz *et al.*, 1980).

I gatti che superano la viremia, normalmente, ma non sempre, sviluppano anticorpi neutralizzanti (Russell e Jarrett, 1978; Lutz *et al.*, 1980). Questi gatti producono anche anticorpi anti-FOCMA (*Feline Oncornavirus-associated Cell Membrane Antigen*) (Essex e Snyder, 1973). Gli anticorpi anti-FOCMA sono rilevati con un *test* di fluorescenza su cellule viventi sfruttando la linea cellulare FL-74. I FOCMA furono a lungo considerati antigeni tumore-associati non di natura virale dal momento che anticorpi specifici anti-FOCMA furono riscontrati non solo in gatti guariti dal FeLV ma anche in animali viremici, nei quali i tumori erano regrediti (Essex e Snyder, 1973; Essex *et al.*, 1976). Da dati sperimentali ottenuti con anticorpi monoclonali si è scoperto che il FOCMA può essere provocato, almeno in parte, dalla gp70 del FeLV sottotipo C, che si ritiene originato da una ricombinazione fra le sequenze della gp70 del sottotipo A e quelle di un FeLV endogeno (Vedbrat *et al.*, 1983; Snyder *et al.*, 1983).

I gatti che hanno superato l'infezione da FeLV sono considerati immuni a una successiva reinfezione. Alcuni gatti, tuttavia, continuano a eliminare il virus dopo la fase viremica. L'eliminazione virale, nonostante l'instaurarsi di una immunità sistemica, può persistere nel latte per diversi mesi, esitando in una infezione dei neonati (Pacitti *et al.*, 1986). Dopo una viremia transitoria l'infezione può rimanere latente. Può essere riattivata *in vivo* con la somministrazione di alte dosi di corticosteroidi o *in vitro* coltivando le cellule del midollo osseo per diverse settimane (Post e Warren, 1980). Normalmente, dopo 6-8 mesi, anche un'infezione latente può essere superata. Tuttavia, un esiguo numero di gatti rimane infetto in modo latente per parecchi mesi (Pacitti e Jarrett, 1985). I meccanismi che portano alla scomparsa della latenza non sono chiariti.

I sintomi della malattia sono raramente evidenziabili durante le prime fasi dell'infezione, quando comincia a instaurarsi la viremia. È il soggetto con viremia persistente che è più probabile che vada incontro a una delle patologie associate all'infezione da FeLV. La mortalità è elevata, tanto che la maggioranza di questi gatti muore entro 3 anni dall'insorgenza della viremia. Lo spettro delle patolo-

gie associate all'infezione da FeLV include differenti tipi di linfosarcoma, leucemia mieloide, anemia, immunosoppressione, disordini neurologici e uno svariato numero di patologie eterogenee.

Diversi meccanismi sono responsabili dell'instaurarsi delle differenti patologie. L'anemia aplastica può essere spiegata tenendo conto della speciale affinità del FeLV per i precursori delle cellule eritroidi. L'immunosoppressione è stata attribuita all'azione di disturbo operata dal FeLV nei confronti praticamente di tutte le funzioni del sistema immunitario (Trainin *et al.*, 1983). Nei gatti viremici le funzioni svolte sia dalle cellule B che T sono diminuite. Un isolato di FeLV altamente immunosoppressivo è stato dimostrato dare origine a DNA virale che non era integrato nel DNA dell'ospite (Hoover *et al.*, 1987). Inoltre, il complesso della fagocitosi dei neutrofili è sensibilmente alterato dalla notevole diminuzione degli stessi o per il fatto che i neutrofili sono funzionalmente danneggiati. In questo contesto è interessante notare il fatto che, anche dopo la fine della viremia, la fagocitosi operata dai neutrofili possa rimanere depressa, come dimostrato dalla loro reazione di chemiluminescenza, marcatamente ridotta. I meccanismi che portano alla formazione di tumori nei gatti con viremia persistente non sono del tutto compresi. Devono sicuramente essere differenti da quelli responsabili di una trasformazione acuta, dal momento che quest'ultima è indotta dal FeSV e dai FeLV che contengono il gene cellulare *myc* (Neil *et al.*, 1984).

Fino ad ora il controllo dell'infezione da FeLV è stato basato interamente sulla diagnosi e sull'eliminazione dei soggetti infetti, programma introdotto 15 anni fa negli USA e in Olanda (Weijer e Daams, 1978). Mentre sono stati descritti diversi vaccini sperimentali (Yohn *et al.*, 1976; Pedersen *et al.*, 1986; Osterhaus *et al.*, 1985, 1989; Gilbert *et al.*, 1987), negli anni recenti sono stati introdotti 2 vaccini commerciali. Il primo vaccino disponibile è stato preparato da Olsen e coll. ed è basato su tecniche di colture cellulari che sfruttano la linea cellulare FL-74 e i FeLV A, B, C (Olsen *et al.*, 1980). Questo vaccino si è dimostrato protettivo nei confronti di una certa quota di animali, ma non del 100% dei soggetti vaccinati, per quanto riguarda la viremia e la formazione di tumori in condizioni sia naturali che sperimentali. Si è discusso sul suo valo-

re per i proprietari di gatti. Il secondo vaccino, introdotto in Francia nel 1988, è costituito dalla gp70 del FeLV A, prodotto con tecniche di ingegneria genetica (Aubert *et al.*, articolo in allestimento).

**Tab. 1: Spettro di patogenicità dei diversi isolati di FeLV**

| Autori | Sottotipo | Malattia |
|---|---|---|
| Rickard *et al.*, 1969 | A | Linfosarcoma timico |
| Theilen *et al.*, 1969 | ABC | Anemia aplastica |
| Hoover *et al.*, 1987 | AB | Immunosoppressione |
| Toth *et al.*, 1986 | AB | Leucemia mieloide |

*Virus del sarcoma felino (FeSV)*

Dal primo isolamento del FeSV (Snyder e Theilen, 1969) si è avuta più di una dozzina di isolamenti. Si ritiene che questi virus si formino *ex-novo* in rare circostanze in gatti infetti da FeLV come risultato della ricombinazione fra geni di FeLV con alcuni geni dell'ospite. In più casi si è visto che il gene cellulare incorporato nel genoma FeSV codifica per una protein-chinasi (per una rassegna vedere Besmer, 1983). Il FeSV di per sé è un virus difettivo in seguito alla perdita di alcuni geni del FeLV durante la replicazione. I geni persi normalmente includono parti del gene *gag*, *pol* e a volte del gene *env*. Se cellule infettate dal FeSV vengono contemporaneamente infettate anche dal FeLV, il FeSV può essere attivato grazie alla funzione *helper* svolta dal FeLV. Come conseguenza, alcune particelle FeLV potrebbero venire a formarsi contenendo il genoma del FeSV. In infezioni sperimentali queste particelle sono in grado di indurre fibrosarcomi che spesso sono multicentrici. In un certo numero di gatti con sarcomi indotti sperimentalmente si ravvisa una dicotomia tra la risposta immunitaria nei confronti del tumore e la viremia del FeLV: mentre il tumore regredisce, la viremia può persistere per mesi (Pedersen *et al.*, 1984). Non è ancora noto se il FeSV si diffonda da gatto a gatto. Fibrosarcomi virus indotti, che compaiono in prima istanza come noduli cutanei e secondaria-

mente metastatizzano in organi interni, sono stati osservati in giovani gatti dopo una viremia da FeLV durata per un lungo periodo. Contrariamente, fibrosarcomi localizzati sono descritti in gatti più anziani normalmente negativi per il FeLV.

## SPUMAVIRUS

### *Feline syncytium forming virus (FeSFV)*

Il primo isolamento di FeSFV è avvenuto nel 1969 da un gatto con un tumore (Riggs *et al.*, 1969). Successivamente il FeSFV è stato isolato in diversi Paesi da animali sia malati che sani. L'incidenza del FeSFV nei vari Paesi varia considerevolmente: mentre Hackett e Manning e Schroyer e Schalby hanno osservato l'infezione da FeSFV in più del 90% dei gatti in California, Jarrett e coll. in Gran Bretagna ed Ellis e coll. in Australia, hanno rilevato un'incidenza inferiore al 20%.

Il virus si trasmette per via intrauterina, alla nascita, con il latte per ingestione di leucociti infetti o con il morso (Pedersen, 1987). Si può isolare facilmente il virus dall'orofaringe o da cellule del *buffy-coat* ma non dal plasma. In coltura il virus induce la formazione di sincizi in 4-10 giorni dopo l'infezione. La sieroconversione avviene 3 settimane dopo l'infezione sperimentale (Pedersen, 1987). Gli anticorpi possono essere evidenziati con l'IFA o con l'immuno-diffusione. La presenza di anticorpi è indicativa dell'infezione. Il FeSFV esiste in diversi sierotipi. Analogamente alla trascrittasi inversa degli oncovirus, anche quella degli spumavirus è $Mn^{++}$ dipendente (Kottwitz e Lutz, osservazione non pubblicata).

Nessun sintomo di malattia è stato trovato dopo l'infezione sperimentale con il FeSFV. Tuttavia, in uno studio si è visto che l'infezione da FeSFV era associata a poliartrite cronica progressiva in un grado statisticamente significativo, e in un altro lavoro è stato osservato che l'incidenza del FeSFV era sensibilmente più alta in gatti con patologie mieloproliferative che in gatti normali di età diversa (Pedersen, 1987). È tuttora ignoto se il FeSFV in combina-

zione con il FeLV o il FIV possa avere un qualche ruolo più o meno importante nel determinare la malattia. Si è visto, tuttavia, che l'infezione da FIV è statisticamente legata all'infezione da FeSFV (Yamamoto *et al.*, 1989).

## LENTIVIRUS

### *Feline immunodeficiency virus (FIV)*

Il primo isolamento di un lentivirus felino è stato fatto in California da Pedersen e coll. (Pedersen *et al.*, 1987). Il virus fu isolato da gatti tenuti in un gattile. Gli animali avevano i sintomi clinici di un'immunosoppressione quali: diarrea, perdita di peso, febbre e infezioni croniche. Dal momento che questo gattile era noto essere esente da FeLV da svariati anni, fu sospettato un virus sconosciuto come responsabile di tale sintomatologia. Per dimostrare la natura infettiva della patologia, iniettarono sangue intero prelevato da un soggetto malato in gatti SPF. Poche settimane più tardi osservarono una linfoadenopatia, febbre e leucopenia nei soggetti inoculati. Sospettando la presenza di un lentivirus furono separati i linfociti e messi in coltura e, dopo stimolazione con IL-2, fu possibile dimostrare la presenza di trascrittasi inversa nel surnatante della coltura cellulare. Il microscopio elettronico rivelò la forma classica di un lentivirus con un *core* composto da un guscio conico e un nucleoide eccentrico. L'attività della trascrittasi inversa era strettamente dipendente dalla presenza di $Mg^{++}$, proprietà tipica dell'HIV e di altri lentivirus. In un primo tempo il virus fu battezzato *feline T-lymphotropic lentivirus (FTLV)* a causa del suo tropismo nei confronti dei linfociti T. È ora stato ribattezzato *feline immunodeficiency virus (FIV)*. Il FIV può essere coltivato e mantenuto in colture primarie o stabilizzate di cellule linfoblastoidi e in cellule renali feline Crandell, ma non in diverse altre linee cellulari continue (Tab. 2).

Il FIV può essere facilmente purificato su un gradiente di saccarosio. Nel *Western blot* il FIV mostra proteine di 10, 17, 25, 42, 55 kD, un *pattern* simile a quello dell'HIV. Il peso molecolare del-

la glicoproteina dell'*envelope* del FIV è ancora sconosciuto (Yamamoto *et al.*, 1988).

Sebbene il FIV assomigli all'HIV morfologicamente, nella costituzione proteica e nell'azione della trascrittasi inversa, esso non è antigenicamente correlato al virus dell'AIDS dell'uomo. Il FIV non è, inoltre, riconosciuto da antisieri contro numerosi altri retrovirus (Tab. 3).

Recentemente il genoma del FIV è stato amplificato per clonazione. Esperimenti di *cross*-ibridizzazione hanno rivelato somiglianze molto strette nella sequenza nucleotidica nei geni *gag* e *pol* tra il FIV e 5 lentivirus (Olmsted *et al.*, 1989).

**Tab. 2: *Range* di cellule ospiti del FIV**

Replicazione riscontrata in:
- colture primarie di linfociti T felini stimolati con lectina e IL-2
- linee cellulari linfoblastoidi T continue (FL-74, LSA-1)
- cellule renali feline Crandell

Replicazione non riscontrata in:
- cellule Fcwf-4 e Fc9 (di origine felina)
- colture di linfociti T di origine umana, canina e murina
- linee cellulari linfoblastoidi T umane (HuT-78, H9, CEM)
- linee cellulari di fibroblasti di pecora

**Tab. 3: Relazione antigenica fra il FIV e gli altri retrovirus**

Nessuna reazione immunologica riscontrata in *Western blot* con anticorpi monoclonali e policlonali specifici per:
- FeLV (virus *in toto*, p10, p12, p15, p27, gp70)
- *RD-114 virus* (virus *in toto*, p28)
- *bovine leukaemia virus* (virus *in toto*)
- HIV (sieri di pazienti, p24)
- *caprine arthritis-encephalitis virus* (sieri di soggetti malati)
- *Visna-Maedi virus* (sieri di soggetti malati)
- *simian immunodeficiency virus*
- *bovine immunodeficiency virus* (sieri di coniglio immunizzato)

Reazioni immunologiche riscontrate con antisieri specifici per:
- FeSFV (componente di 42.000 dalton)
- *equine infectious anaemia virus* (p24)
- *caprine arthritis-encephalitis virus* (sieri di coniglio immunizzato)
- *Visna-Maedi virus* (sieri di coniglio immunizzato)

---

Nelle ricerche di trasmissione sperimentale della malattia, utilizzando il virus originario californiano e gatti SPF, abbiamo osservato episodi febbrili transitori, linfoadenopatia (dalla 4ª alla 20ª settimana) e neutropenia (dalla 5ª alla 10ª settimana). Al momento della stesura di questo articolo, i gatti erano in esperimento da oltre 18 mesi e, a parte i sintomi sopra menzionati, non hanno manifestato nessun altro segno di malattia. Se i gatti siano già immunosoppressi in questa prima fase o se l'immunosoppressione sopraggiunga solo dopo anni di infezione persistente non è ancora noto. Normalmente la diagnosi dell'infezione è fatta ricercando gli anticorpi contro il FIV. Gli anticorpi possono essere evidenziati con un *test* di immunofluorescenza usando linfociti di gatto infettato dal FIV come substrato. A volte i risultati dell'IFA sono difficili da giudicare. In questi casi i campioni di siero possono essere testati per conferma con il *Western blotting*. Oltre a questi due metodi, è oggi disponibile un *kit* del commercio basato sulla tecnica ELISA (Iddex Inc., Portland, ME) che consente una rapida ricerca degli anticorpi. Quando l'evoluzione dell'infezione sperimentale del FIV veniva monitorata sfruttando le varie tecniche diagnostiche, si è dimostrato che l'infezione può essere diagnosticata con l'isolamento del virus, l'IFA, l'ELISA e il *Western blot* già 2 settimane dopo l'inoculazione (Yamamoto *et al.*, 1988).

È riconosciuto da tutti che un gatto sieropositivo è un soggetto infetto.

Tuttavia, non tutti i gatti infetti da FIV sono sieropositivi. Lo abbiamo osservato in uno dei nostri esperimenti sullo studio degli effetti di un'infezione contemporanea con FIV e FeLV. In un gruppo di 5 gatti positivi per FeLV, 4 animali mostrarono sieroconversione da 2 a 4 settimane dopo l'infezione con FIV. Un gatto, che successivamente fu soppresso con eutanasia per problemi di anemia, non sviluppò mai anticorpi riscontrabili, anche se il FIV fu isolato

da 3 campioni consecutivi in un periodo di 3 settimane. In condizioni naturali la situazione potrebbe essere la stessa: Hopper e coll. dell'Università di Bristol hanno osservato che più del 15% dei gatti infettati da FIV, in special modo se malati, può essere sieronegativo (Hopper, comunicazione personale, 1988). Questi dati indicano che la ricerca degli anticorpi verso il FIV non è un metodo valido per la diagnosi di questa infezione. Dopo la sua scoperta, il FIV fu isolato successivamente in Gran Bretagna (Harbour *et al.*, 1988) e da quel momento in poi è stato trovato in tutto il mondo. La sua incidenza varia notevolmente nei diversi Paesi e aree (Grindem *et al.*, 1989, Ishida *et al.*, 1989; Yamamoto *et al.*, 1989). In un'analisi sierologica sull'infezione da FIV condotta in alcuni Paesi europei, abbiamo trovato l'incidenza espressa nella Tab. 4.

**Tab. 4: Incidenza dell'infezione da FIV in popolazioni feline, selezionate, di alcuni Paesi europei***

| Nazione | Percentuale degli animali FIV-positivi | |
|---|---|---|
| | Gatti malati | Gatti sani |
| Svizzera | 3,7% (775) | 2,8% (178) |
| Francia | 33,1% (208) | ——— |
| Gran Bretagna | 12,8% (431) | 0,0% (98) |
| Olanda | 3,0% (98) | 1,0% (123) |
| Germania Ovest** | 2,4% (328) | 0,0% (128) |

Totale dei gatti esaminati: 2367

* Il gruppo dei gatti ammalati comprendeva animali sottoposti alla visita clinica per varie ragioni. I sieri dei gatti francesi provenivano da animali sottoposti a necroscopia. I sieri dei gatti sani sono stati prelevati prevalentemente da animali prima della vaccinazione contro il FeLV.
** Campioni forniti dal Prof. Dr. W. Kraft e dal Dr. K. Hartmann, Monaco.

L'età media dei gatti infetti da FIV con sintomatologia clinica in condizioni naturali è di circa 10 anni, mentre quella dei gatti FIV-positivi ancora sani è più bassa, con una media intorno ai 4 anni. Da questa osservazione si può evincere che possono passare molti anni dal momento del contatto con il FIV e la comparsa dei primi sintomi.

Questa osservazione offre anche una spiegazione per un altro nostro dato, cioè che in alcune comunità feline è stata trovata una percentuale relativamente elevata di gatti FIV-positivi sani. Il 70-90% dei gatti FIV infetti sono maschi con possibilità di uscire dalle abitazioni (Yamamoto *et al.*, 1988). Sebbene l'esatta via di trasmissione in condizioni naturali non sia stata ancora chiarita, l'ultimo dato suggerisce che il FIV venga trasmesso con la saliva attraverso i morsi (Yamamoto *et al.*, 1989). Lotte e morsi sono comportamenti naturali per la difesa del territorio, specialmente fra gatti maschi. Che il morso possa essere un'importante via di trasmissione è anche supportato dalle osservazioni di Pedersen e coll. (comunicazione personale, 1988), che sono riusciti a far trasmettere l'infezione attraverso morsi artificiali da soggetti infetti da FIV a gatti SPF anestetizzati, e dai risultati di Yamamoto e coll. (1989) che hanno dimostrato l'eliminazione del FIV attraverso la saliva in 5 su 5 gatti FIV infetti. E' interessante sottolineare che il FIV non è quasi mai trasmesso per contatto tra gatti abituati a vivere secondo regole sociali in un gattile (Yamamoto *et al.*, 1989). Molto sorprendente è il fatto che il FIV non venga trasmesso dalla madre ai figli. Abbiamo testato 9 gattini nati da 2 madri infettate con il FIV tramite iniezione. Il virus non è stato isolato da nessuno dei gattini e all'età di 4 settimane gli anticorpi materni erano quasi scomparsi (Lutz *et al.*, osservazioni non pubblicate, 1988). Stessi risultati sono stati riscontrati dal gruppo di Pedersen (Yamamoto *et al.*, 1988). Questa osservazione è in contrasto con il comportamento degli altri retrovirus felini FeLV e FeSFV, dove la trasmissione dalla madre alla prole, sia in utero che attraverso colostro e latte, è stata ben documentata.

Il quadro sintomatologico dei gatti naturalmente infetti da FIV è abbastanza eterogeneo. In tutto il mondo si sono osservati, nei gatti infetti da FIV, sintomi della malattia simili, in special modo lesioni al cavo orale (Tab.5).

I meccanismi che conducono alle diverse manifestazioni patologiche non sono noti. Una spiegazione generale dello sviluppo della malattia consisterebbe nell'immunosoppressione determinata dall'inibizione operata dal FIV sulla cooperazione fra cellule B e T, o dalla neutropenia spesso riscontrata in corso di infezione da FIV.

**Tab. 5: Spettro della patologia nei gatti naturalmente infetti da FIV**

| |
|---|
| Patologie del cavo orale |
| - gengiviti |
| - stomatiti |
| - periodontiti |
| Infezioni delle vie aeree superiori |
| Enteriti croniche |
| Perdita di peso |
| Febbre |
| Anoressia |
| Linfoadenopatia |
| Leucopenia |
| Ascessi |
| Dermatiti e altre malattie cutanee |
| Disordini del SNC |

Tuttavia, a tutt'oggi, non esistono dati sperimentali che dimostrino direttamente il meccanismo immunosoppressivo del FIV. Non sorprende il fatto che i nostri gatti infettati sperimentalmente con FIV non abbiano sviluppato sintomi della malattia, dal momento che tutti questi animali provengono da gattili con gabbie separate e sono sempre stati tenuti in condizioni SPF, esenti da altri patogeni felini come *Calici-, Herpes-, Corona-* e *Parvovirus,* funghi, micoplasmi, clamidie e parassiti. Particolarmente interessante la questione se il FIV possa costituire un pericolo per l'uomo e altre specie animali. Dal momento che il FIV non si replica in colture primarie di linfociti T stimolati con PHA e IL-2 prelevati da uomini donatori (10 soggetti) e da topi e cani, si può cautamente concludere che il FIV è ristretto alla specie felina (Yamamoto *et al.*, 1988). Questo è avvallato anche dai nostri esperimenti, con i quali abbiamo analizzato 25 campioni di siero raccolti da veterinari liberi professionisti e da custodi di animali che hanno lavorato con gatti malati per un tempo complessivo di oltre 150 anni. Il *Western blot* non ha evidenziato anticorpi verso le proteine del FIV in nessuno dei campioni. Nell'insieme, queste 25 persone sono state morsicate da gatti diverse centinaia di volte. Considerando l'incidenza dell'infezione da FIV in Svizzera (tra i gatti malati per lo meno del 4%), dozzine di questi morsi dovevano provenire da gatti FIV in-

fetti. Da queste osservazioni si può concludere che il FIV non viene trasmesso all'uomo. Tuttora non si conosce nulla circa la storia naturale del FIV. Dimostrazioni di infezione da FIV sono state fatte in sieri raccolti in Gran Bretagna nel 1975 e 1976 (Gruffydd-Jones *et al.*, 1988). Tuttavia, dal momento che è antigenicamente distinto dagli altri lentivirus, può essere postulato che il FIV sia esistito da più lungo tempo nel gatto domestico e che sia altamente adattato alla specie felina. Analisi genetiche più dettagliate potranno svelare relazioni evoluzionistiche con gli altri lentivirus. L'importanza dell'infezione da FIV nei gatti domestici è stata chiaramente dimostrata. Ricerche future dovrebbero concentrarsi sulla delucidazione dei meccanismi che conducono allo sviluppo della patologia, su misure atte al controllo dell'infezione, sulla questione se i gatti infetti da FIV possano essere efficacemente vaccinati nei confronti dei comuni patogeni del gatto, e sull'approntamento di un eventuale vaccino. Oltre alla sua importanza in medicina veterinaria, l'infezione da FIV può costituire un utile modello di studio per l'AIDS. L'infezione da FIV ha diverse caratteristiche in comune con l'infezione da HIV e i gatti sono, al contrario dei primati, facilmente disponibili.

## BIBLIOGRAFIA


BESMER P. (1983). Acute transforming feline retroviruses. *Curr. Topics Microbiol. Immunol., 107,* 1.

ESSEX M., SNYDER S.P. (1973). Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen. I. Serological studies with kittens exposed to cell-free materials from various feline fibrosarcomas. *J. Natl. Cancer Inst., 51,* 1007.

ESSEX M., SLISKI A., HARDY W.D., COTTER S.M. (1976). Immune response to leukemia virus and tumor-associated antigens in cats. *Cancer Res., 36,* 640.

GILBERT J.H., PEDERSEN N.C., NUNBERG J.H. (1987). Feline leukemia virus envelope protein expression encoded by a recombinant vaccinia virus: apparent lack of immunogenicity in vaccinated animals. *Vir. Res., 7,* 49.

GRINDEM C.B., CORBETT W.T., AMMERMANN B.E., TOMKINS M.T. (1989). Seroepidemiologic survey of feline immunodeficiency virus infection in cats of Wake County, North Carolina. *J. Am. Vet. Med. Assoc., 194,* 226.

GRUFFYDD-JONES T.J., HOPPER C.D., HARBOUR D.A., LUTZ H. (1988). Serological evidence of feline immunodeficiency virus infection in UK cats from 1975-76. *Vet. Rec., 123,* 569.

HARBOUR D.A., WILLIAMS P.D., GRUFFYDD-JONES T.J., BURBRIDGE J., PEARSON G.R. (1988). Isolation of a T-lymphotropic lentivirus from a persitently leucopenic domestic cat. *Vet. Rec., 122,* 84.

HARDY W.D. (1980). The virology, immunology and epidemiology of the feline leukemia virus. In: W.D. Hardy, M. Essex, A.J. McClelland (editors), Feline leukemia virus, Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 33.

HOOVER E.A., MULLINS J.I., QUACKENBUSH S.L., GASPER P.W. (1987). Experimental transmission and pathogenesis of immunodeficiency syndrome in cats. *Blood, 70,* 1880.

ISHIDA T., WASHIZU T., TORIYABE K., MOTOYOSHI S., TOMODA I., PEDERSEN N.C. (1989). Feline immunodeficiency virus infection in cats of Japan. *J. Am. Vet. Med. Assoc., 194,* 221.

JARRETT W.F.H., CRAWFORD E.M., MARTIN W.B., DAVIE F. (1964). A virus-like particle associated with leukemia (lymphosarcoma). *Nature, 202,* 567.

LUTZ H., JARRETT O. (1987). Detection of feline leukemia virus infection in saliva. *J. Clin. Microbiol., 25,* 827.

LUTZ H., PEDERSEN N.C., HIGGINS J., TROY F.A., THEILEN G.H. (1980). Long-term immune response to feline leukemia virus components in cats after natural infection. In: M. Essex, G. Todaro, H. ZurHausen (editors), Viruses in naturally occuring cancers. Cold Spring Harbor Conf. Cell Prolif., 7, 653.

LUTZ H., PEDERSEN N.C., DURBIN R., THEILEN G.H. (1983a). Monoclonal antibodies to three epitopic regions of feline leukemia virus p27 and their use in ELISA of p27. *J. Immunol. Meth., 56,* 208.

LUTZ H., JARRETT O., SUTER P.F. (1983b). A one-step ELISA for the rapid detection of feline leukemia virus infection using monoclonal antibodies; fur-

ther investigations. In: B. Feldmann, R. Masseyeff (editors), Immunoenzymatic techniques, Elsevier/North Holland, Amsterdam, pp. 363.

McAllister R.M., Nicholson M., Gardner M.B., Rongey R.W., Rasheed S., Sarma P.S., Hubner R.J., Hatanaka M., Oroszlan S., Gilden R.W., Kabigtin A., Vernon L. (1972). C-type virus released from cultured human rhabdomyosarcoma cells. *Nature New Biol., 235,* 3.

Neil J.C., Hughes D., McFarlane R., Wilkei N.M., Onions D.E., Lees G., Jarrett O. (1984). Transduction and rearrangement of the myc gene by feline leukemia virus in naturally occuring T cell leukemia. *Nature, 308,* 814.

Olmsted R.A., Barnes A.K., Yamamoto J.K., Hirsch V.M., Purcel R.H., Johnson T.R. (1989). Molecular cloning of feline immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86,* 2448.

Osterhaus A., Weijer K., UytdeHaag F., Knell P., Akerbloom L., Morein B. (1989). Serological responses in cats vaccinated with FeLV ISCOM and an inactivated FeLV vaccine. *Vaccine, 7,* 137.

Pacitti A.M., Jarrett O., Hay D. (1986). Transmission of feline leukemia virus in the milk of a non-viraemic cat. *Vet. Rec., 118,* 381.

Pedersen N.C. (1987). Feline syncytium-forming virus. In: M. Appel, M.C. Horzinek (editors), Virus infections of carnivores, Elsevier, Amsterdam, pp. 329.

Pedersen N.C., Johnson L., Theilen G.H. (1984). Biological behavior of tumor associated retroviraemia in cats inoculated with Snyder-Theilen fibrosarcoma virus and the phenomenon of tumor recurrence after primary regression. *Infect. Immun., 43,* 631.

Pedersen N.C., Johnson L., Birch D., Theilen G.H. (1986). Possible immunoenhancement of persistent viraemia by feline leukemia virus envelope glycoprotein vaccines in challenge exposure situation where whole inactivated virus vaccines were protective. *Vet. Immunol. Immunopath., 11,* 123.

Pedersen N.C., Ho E.W., Brown M.L., Yamamoto J.K. (1987). Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science, 235,* 790.

Post J.E., Warren L. (1980). Riactivation of latent feline leukemia virus. In: W.D. Hardy, M. Essex, A.J. McClelland (editors), Feline leukemia virus. Dev. Cancer Res., Elsevier/North Holland, Amsterdam, vol. 4, 151.

Rickard C.G., Post J.E., Noronha F., Barr L.M. (1969). Transmissible virus induced lymphocytic leukemia of the cat. *J. Natl. Cancer Inst., 42, 987.*

Riggs J.L., Oshiro L.S., Taylor D.O.N., Lenette E.H. (1969). Syncytium-forming agent isolated from domestic cats. *Nature, 11,* 1190.

Russell P.H., Jarrett O. (1978). The occurrence of feline leukemia virus neutralizing antibodies in cats. *Int. J. Cancer, 22,* 351.

Shelton G.H., Abkowitz J.L, Linenberger M.L, Russell R.G., Grant C.K. (1989). Chronic leukopenia associated with feline immunodeficiency virus infection in a cat. *J. Am. Vet. Med. Assoc., 194,* 253.

Snyder H.V., Singhal M.C., Zuckermann E.E., Jones G.R., Hardy W.D.

(1983). The feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA) is related to, but distinguishable from, FeLV-C gp70. *Virology, 131,* 315.

SNYDER S.P., THEILEN G.H. (1969). Transmissible feline fibrosarcoma. *Nature, 221,* 1074.

THEILEN G.H., KAWAKAMI T.G., RUSH J.D., MUNN R.J. (1969). Replication of cat leukemia virus in cell suspension cultures. *Nature, 222,* 589.

TOTH S.R., ONIONS D.E., JARRETT O. (1986). Histopathological and haematological findings in myeloid leukemia induced by a new feline leukemia virus isolated. *Vet. Pathol., 23,* 462.

TRAININ Z., WERNICKE B., UNGAR-WARON H., ESSEX M. (1983). Suppression of the humoral antibody response in natural retrovirus infection. *Science, 220,* 858.

VEDBRAT S.S., RASHEED S., LUTZ H., GONDA M., RUSCETTI S., GARDNER M.B., PRENSKY W. (1983). Feline oncornavirus-associated cell membrane antigen (FOCMA): a viral and not a cellularly coded transformation-specific antigen of cat lymphomas. *Virology, 124,* 445.

WEIJER K., DAAMS J.H. (1976). The presence of leukemia (lymphosarcoma) and feline leukemia virus (FeLV) in cats in the Netherlands. *Small Anim. Pract., 17,* 649.

YAMAMOTO J.K., SPARGER E., HO E.W., ANDERSEN P.R., O'CONNOR T.P., MANDELL C.P., LOWENSTINE L., MUNN R., PEDERSEN N.C. (1988). Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. *Am. J. Vet. Res., 49,* 1246.

YAMAMOTO J.K., HANSEN H., HO E.W., MORISHITA T.Y., OKUDA T., SAWA T.R., NAKAMURA R.M., PEDERSEN N.C. (1989). Epidemiologic and clinical aspects of feline immunodeficiency virus infection in cats from the continental United States and Canada and possible mode of transmission. *J. Am. Vet. Med. Assoc., 194,* 213.

YOHN D.S., OLSEN R.G., SHALLER J.P., HOOVER E.A., MATHES L.E., HEDING L., DAVIS G.W. (1976). Esperimental oncornavirus vaccines in the cat. *Cancer Res., 36,* 646.

G. ACHILLI, E. CATTANEO

# DIAGNOSI DI INFEZIONE DA HIV-1

Laboratorio Retrovirus, Istituto Malattie
Infettive, IRCCS-Policlinico S. Matteo, Pavia

È stato ampiamente documentato che il virus HIV, agente eziologico dell'AIDS, si replica in differenti tipi di cellule (monociti, macrofagi, cellule giganti, gliali, neuroni).

L'infezione avviene in quanto le cellule sono dotate di determinanti antigenici di superficie (CD4), che permettono l'attaco della glicoproteina virale dell'*envelope* (gp120), l'ingresso e la successiva integrazione del genoma virale (provirus) nel DNA della cellula, fase indispensabile per dare origine al processo replicativo del virus.

La diagnosi dell'infezione può essere effettuata con metodiche dirette ed indirette[1, 2].

## METODI DIRETTI

**1) Microscopia elettronica**
**2) Isolamento dai linfociti, liquidi biologici e tessuti**
**3) Ibridazione *in situ***
**4) *Polymerase chain reaction***

L'impiego del **microscopio elettronico** può essere di grande utilità nell'evidenziare la presenza di particelle virali direttamente nei tessuti. Recenti studi ultrastrutturali su prelievi bioptici ed autoptici di tessuto nervoso prelevato da pazienti con encefalopatie AIDS-correlate, hanno rivelato la presenza di molte particelle virus-*like* del diametro di 90-140 nm, dotate di doppia membrana e contenenti nucleoidi cilindrici caratteristici dei lentivirus[3].

La presenza del virus HIV-1 può essere determinata per mezzo delle classiche **tecniche di isolamento**[4] (Fig. 1).

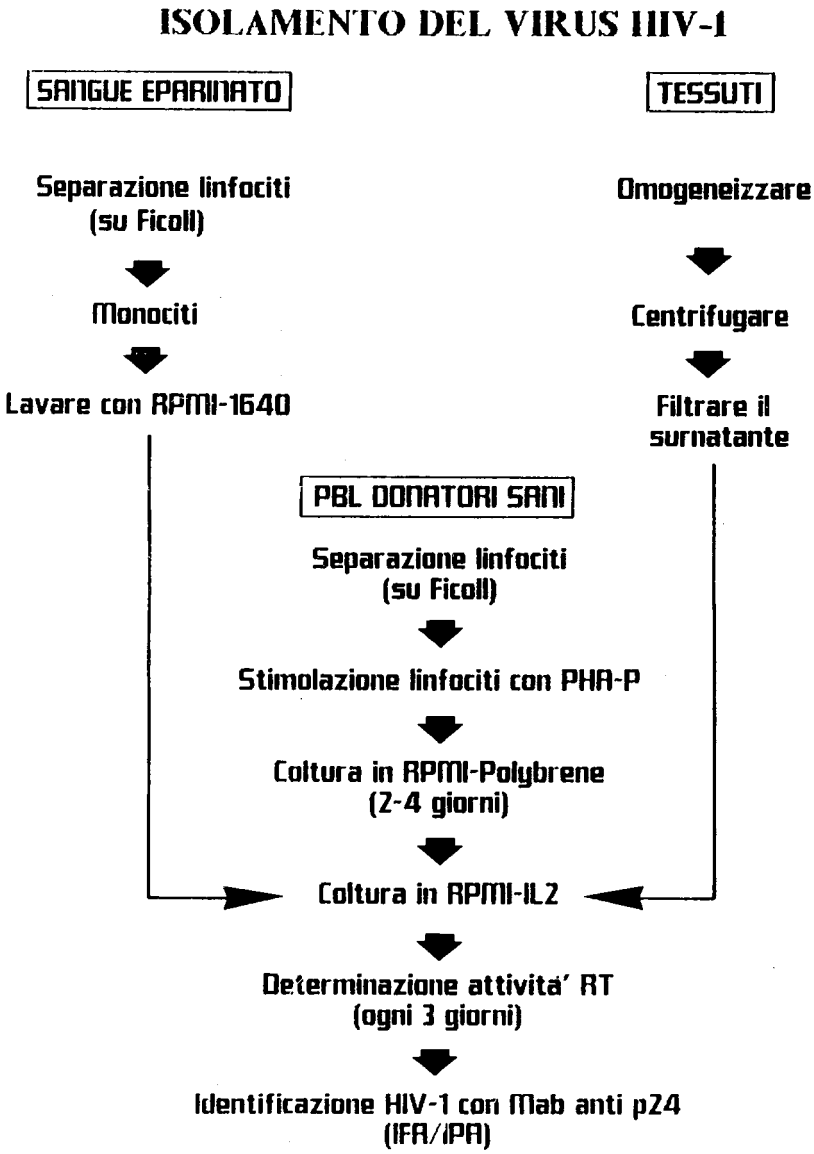



Fig. 1 - Schema descrittivo della metodica per l'isolamento del virus HIV-1

Il plasma ottenuto da 20 ml di sangue eparinato lasciato a temperatura ambiente per 30' viene stratificato in rapporto 1:2 su LSM (Ficoll) e centrifugato 30'/400g/20x°C. I linfociti vengono raccolti, lavati con RPMI-1640 e messi in coltura con RPMI-1640 *plus* 20% FBS e PHA-P 5μg/ml per 48-72 h, quindi vengono lavati e messi in coltura in *medium plus* 10% Interleukina-2, 5 μg/ml di idrocortisone e monitorizzati ad intervalli di tre giorni dalla 3ª giornata determinando sia l'attività dell'enzima trascrittasi inversa nel surnatante che l'espressione degli antigeni virali nei linfociti mediante immunofluorescenza indiretta utilizzando anticorpi monoclonali specifici (Fig. 2).

Una metodica di recente introduzione denominata "***Ibridazione in situ***"[5], permette di evidenziare l'RNA del virus HIV-1 nella cellula ospite utilizzando sonde costruite con frammenti di RNA virale e marcate con isotopi radioattivi od enzimi (Fig. 3).

Recentemente è stata messa a punto la metodica denominata ***Polymerase chain reaction*** (PCR) che permette di amplificare fino ad un milione di volte un frammento di DNA, appartenente al provirus HIV-1 integrato nel genoma cellulare [6].

Dopo lisi e digestione delle proteine cellulari, il DNA viene posto in una miscela di reazione contenente due *primers* complementari alla sequenza da amplificare ed una polimerasi termoresistente (*taq* polimerasi). Mediante cicli successivi di denaturazione del DNA, appaiamento dei *primers* alla sequenza prescelta e allungamento (cicli condotti a temperature appropriate), il frammento di DNA compreso fra i due *primers* viene amplificato fino ad un milione di volte. Il prodotto della reazione viene messo in soluzione in presenza della sonda radioattiva di sequenza complementare ad una regione del frammento medesimo. L'avvenuto riconoscimento si osserva dopo corsa su gel di acrilamide ed esposizione autoradiografica (*liquid hybridization*). In alternativa a questa tecnica si può applicare anche la metodica *Southern Blot*.

Queste tecniche diagnostiche dirette sono complesse, richiedono tempi di esecuzione relativamente lunghi, laboratori particolarmente attrezzati, personale altamente specializzato e pertanto, pur essendo dirimenti per una sicura diagnosi eziologica, pochi sono i laboratori in grado di effettuarle.

## METODI INDIRETTI

Attualmente la diagnosi di infezione da HIV viene generalmente ottenuta utilizzando metodiche sierologiche che determinano la presenza nel siero, nel liquor, e/o in altri liquidi biologici, degli anticorpi HIV-1 specifici.

Per effettuare una corretta diagnosi sierologica di infezione da HIV-1 si deve determinare nel siero del paziente la presenza di IgG HIV-specifiche.

Le tecniche sierologiche più comunemente usate sono:
1) IFA/IPA
2) ELISA
3) *Western Blot*
4) ELISA di cattura per la determinazione della proteina p24
5) *Test* di neutralizzazione

**L'immunofluorescenza indiretta** è stato il primo *test* utilizzato per la ricerca di anticorpi HIV-I specifici nei sieri di pazienti che manifestavano segni clinici di malattia[7]. Il siero e/o il liquor in esame veniva cimentato con linfociti derivati da colture di mononucleati di pazienti con AIDS o da linee linfocitarie immortalizzate con il virus HIV-I e fissati su vetrino; quindi veniva aggiunto un antisiero coniugato con fluorescina e l'eventuale reazione era letta al microscopio a fluorescenza (Fig. 4).

Questo metodo diagnostico è uno dei più standardizzati e maggiormente adottato presso i laboratori di immunologia clinica e microbiologica ma non è di facile esecuzione: la lettura dei risultati è solitamente soggettiva e la sua sensibilità non è elevata in special modo con i sieri a basso titolo anticorpale.

**Il *test* ELISA** è la metodica attualmente più utilizzata per la determinazione degli anticorpi virus specifici ([8, 9, 10, 11]) ed anche per la diagnostica delle infezioni da HIV-1, con la realizzazione di colture linfocitarie cronicamente infettate da HIV-1 da utilizzare come fonti di antigene, si sono potuti allestire *kit* ELISA sia di tipo indiretto, sia di competizione, utili nello *screening* della popolazione a rischio per l'infezione.

Nella metodica ELISA di tipo indiretto per la determinazione delle immunoglobuline di classe G, il *coating* dei pozzetti della micropiastra viene effettuato impiegando virus purificato ed inattivato; i campioni in esame vengono incubati nei pozzetti e gli anticorpi anti HIV-I, se presenti, reagiranno con l'antigene legato alla fase solida.

Successivamente si aggiunge un antisiero anti IgG umane coniugato con un enzima che reagirà con il complesso antigene-anticorpo formatosi in precedenza. L'incubazione con l'opportuno substrato produrrà lo sviluppo di una colorazione che verrà letta mediante l'uso di uno fotometro. Nel *test* ELISA di competizione il siero in esame e gli anticorpi coniugati con l'enzima entreranno in competizione tra di loro per legarsi all'antigene adeso alla fase solida; più alta è la concentrazione di anticorpi meno coniugato potrà fissarsi e pertanto l'intensità della reazione con il substrato cromogeno sarà inversamente proporzionale alla concentrazione di anticorpo presente nel campione in esame.

Il punto critico di tali metodiche risiede nella qualità dell'antigene impiegato nella fase di *coating*.

La purificazione dell'antigene deve essere spinta al massimo ma, anche impiegando ottimi antigeni, si incorre nella possibilità di ottenere risultati falsamente positivi dovuti a *cross*-reattività con sostanze di derivazione dalla linea cellulare usata per la produzione del virus.

Per ovviare a questi inconvenienti sono stati approntati dei *kit* ELISA che prevedono controlli della specificità della reazione dei singoli sieri in esame, cimentando gli stessi sia con l'antigene (HIV-I) sia con antigene aspecifico derivato dalla medesima linea cellulare, non infettata, usata per la produzione dell'antigene virale.

Un altro approccio per superare le difficoltà che si incontrano nella preparazione dell'antigene da utilizzare nella fase di *coating* e per ottenere un prodotto privo di qualsivoglia determinante non specifico, è stato quello dell'impiego della tecnica del DNA ricombinante per produrre antigeni chimerici di tipo ibrido che contengano regioni derivate dalla glicoproteina *trans* membrana dell'*envelope* gp41 e dalla proteina del *core* p24, tipiche di tutte gli HIV-I isolati. Sono stati prodotti anche peptidi sintetici che corrispondo-

no agli epitopi sierologicamente attivi delle proteine virali p18, p24, gp41 e gp120 da utilizzare nella fase di *coating* dei pozzetti. Tuttavia anche impiegando *kit* di questo tipo sono state osservate reazioni non specifiche, soprattutto in soggetti politrasfusi od affetti da patologie autoimmunitarie[11]. I risultati ottenuti con la metodica ELISA hanno comunque bisogno di conferma.

Le metodiche *Western Blot* e RIPA (radioimmunoprecipitazione) sono le più comunemente utilizzate come *test* di conferma.

La **tecnica *Western Blot*** ci fornisce un quadro della reattività del siero, rivelatosi positivo in ELISA, verso le differenti catene polipeptidiche dell'HIV-I, separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide e trasferite su fogli di nitrato di cellulosa[12, 13]. I sieri vengono considerati positivi se è contemporaneamente evidente una reattività sia verso una glicoproteina dell'*envelope* (gp41, gp120, gp160) sia verso la maggior proteina del *core* p24 o il suo precursore, la proteina p55. La positività verso le sole proteine del *core* non è sufficiente per confermare la positività del siero in esame, in quanto in letteratura sono oramai numerose le segnalazioni di false reattività verso la p24 e p55 dovute probabilmente a *cross* reazioni con normali i costituenti cellulari come ad esempio le ribonucleoproteine (Figg. 5 e 6).

Il ***test* di radioimmunoprecipitazione**, pur essendo altamente sensibile e specifico, non ha una grande diffusione poiché richiede l'impiego di radioisotopi, di colture di linfociti infettati con l'HIV-I e pertanto è alla portata di pochi laboratori specializzati[14, 15].

Le metodiche finora illustrate ci forniscono l'indicazione della presenza o meno di anticorpi verso il virus HIV-I, ma non sono in grado di darci indicazioni sulla qualità degli anticorpi e cioè non è possibile valutare se questi siano protettivi verso l'agente infettante. Una risposta a questo quesito ci può essere fornita unicamente valutando la presenza di anticorpi neutralizzanti.

Il ***test* di neutralizzazione** comporta l'uso di particelle virali infettanti, colture di linee linfocitarie permissive, la disponibilità di un laboratorio di alta sicurezza (classe P3) e personale altamente qualificato.

Il *test* di neutralizzazione è comunque l'unico in grado di poter valutare con estrema precisione la presenza di anticorpi neutraliz-

zanti anti HIV-I e quindi di determinare l'ipotetica protezione di un individuo verso il retrovirus e l'efficacia di un eventuale vaccino[16, 17].

In conclusione la determinazione del titolo anticorpale deve essere effettuata utilizzando metodiche basate su differenti principi e solo la concordanza dei risultati ottenuti con l'applicazione di diversi metodi ci permette una precisa valutazione dello stato immunitario di un individuo[18].

Il ***test ELISA* di cattura** per la determinazione della proteina p24 viene effettuato legando sul fondo dei pozzetti delle micropiastre un siero monoclonale anti-p24. Viene aggiunto il campione in esame (siero, liquor, surnatante di colture cellulari per l'isolamento dell'HIV-I) ed infine un anticorpo monoclonale anti-p24 marcato con perossidasi. L'aggiunta dell'idoneo substrato darà origine, nel caso di presenza di antigene p24, ad una colorazione la cui intensità verrà letta spettrofotometricamente[19].

La presenza della proteina p24, maggiore proteina del *core* dell'HIV, è determinabile nel siero e nel liquor, dopo l'infezione primaria, prima della produzione da parte dell'organismo degli anticorpi virus specifici.

Con la comparsa degli anticorpi spesso l'antigene circolante non è più determinabile, mentre gli stadi terminali della malattia sono caratterizzati da una aumentata produzione di antigene e da una diminuzione sino alla completa scomparsa degli anticorpi anti-p24.

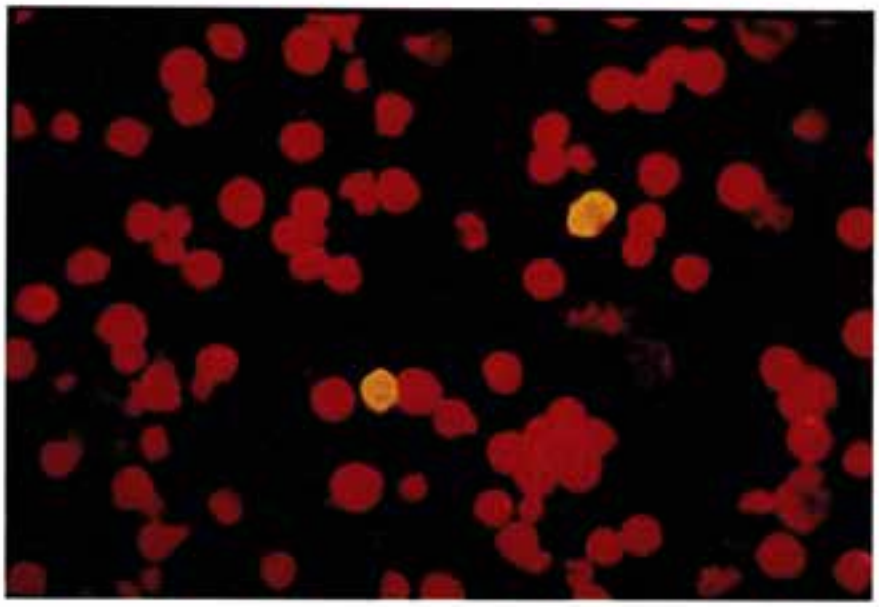


Fig. 2 - Linfociti umani positivi per HIV-1 (cellule fluorescenti giallo-verdastre) svelati mediante IFA utilizzando un anticorpo monoclonale anti-p24. Le cellule non infette si sono controcolorate in rosso.

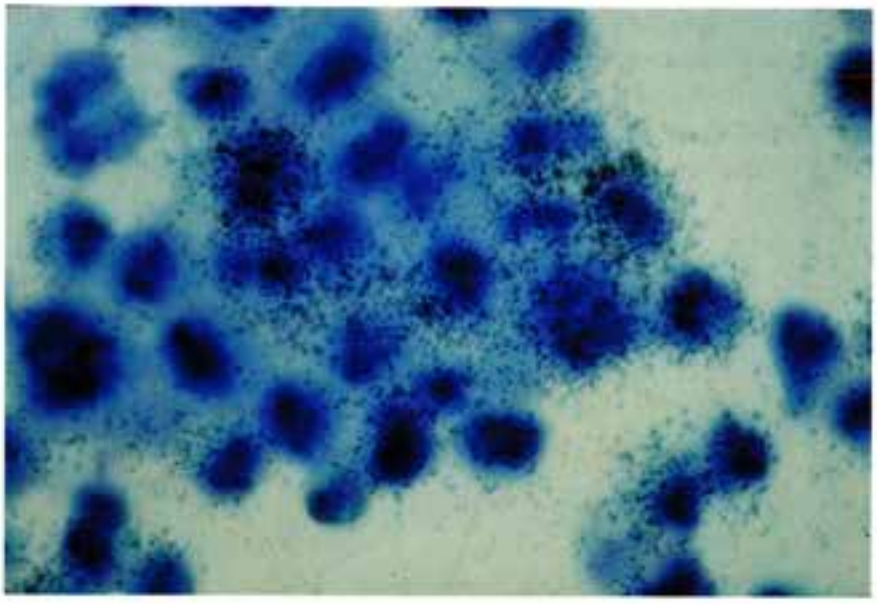


Fig. 3 - Positività per HIV-1 in linfociti periferici determinata mediante il *test* "Ibridazione *in situ*".

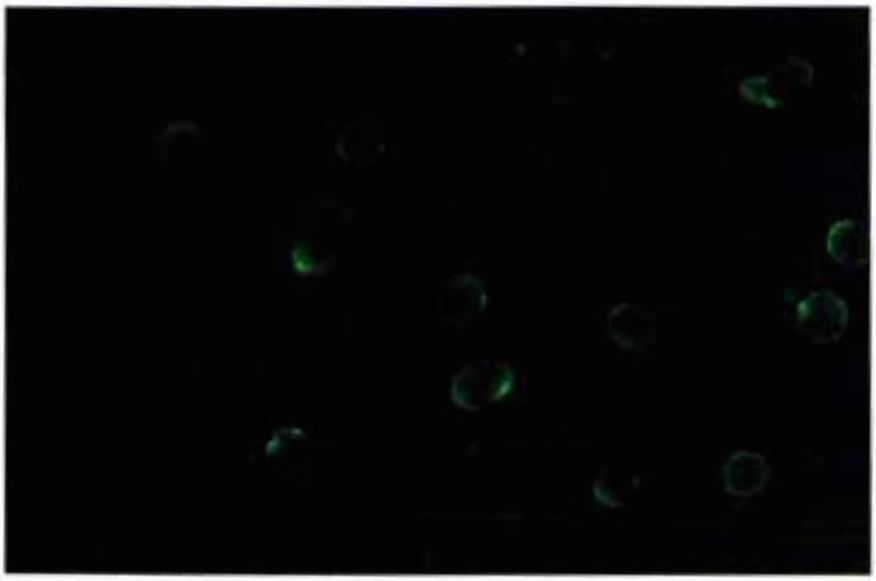


Fig. 4 - Siero positivo per anticorpi anti-HIV mediante il *test* IFA: gli anticorpi specifici hanno reagito con gli antigeni virali espressi sulla membrana di cellule infette.

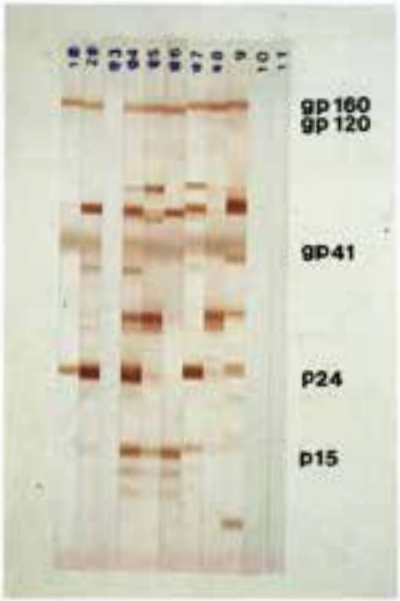



Fig. 5 - *Patterns* di reattività in *Western blot* di sieri di soggetti HIV-1 positivi

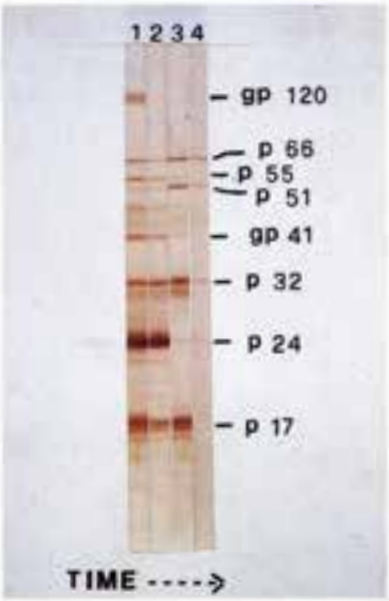



Fig. 6 - *Patterns* sequenziali di reattività in *Western blot* di un soggetto sieropositivo. All'ultimo prelievo, con AIDS conclamata, scompare ogni reattività a causa della imponente immunosoppressione.

## BIBLIOGRAFIA


1. Gallo R.C. et al. *Science 224,* 500, 1984.
2. Barre Sinoussi F. et al. *Science 220,* 869, 1983
3. Sharer L.R. et al. *Human path. 17,* 271, 1986
4. Popovic M. et al. *Science 224,* 497, 1984
5. Harper M. et al. *Pnas 83,* 772, 1986
6. Saiki R.K. et al. *Science 239,* 487, 1988
7. Kawamura A. Fluorescent antybodies tecniques and their applications, 2nd Edition, University Park Press, Baltimore, 1977
8. Lennette E.T. et al. *J. Clin. Microb. 25,* 199, 1987
9. Getchell J.P. et al. *J. Clin. Microb. 23,* 737, 1986
10. Voller A. et al. *Br. J. Exp. Patol. 57, 243,* 1976
11. Saxinger W.C. et al. *Lab. Invest. 49,* 371, 1983
12. Towbin et al., *Pnas Usa 76,* 4350, 1979
13. Tsang V.C. et al., *Immunology series N. 15, PHS, CDC,* 1986
14. Kalyanaraman V.S. *Nature 294,* 271, 1981
15. Lee T.H. *Pnas Usa, 81,* 3856, 1984
16. Robert-Guroff M., et al. Nature, 316, 72, 1985
17. Weiss R.A. et al. *Nature 316,* 69, 1985.
18. Barnes D.M., *Science 233,* 1149, 1986
19. Lange J.M.A. et al. *Br. Med. J. 292,* 298, 1986.

G. FILICE, P. ORSOLINI, L. SOLDINI, E. RAZZINI,
R. GULMINETTI, P.M. CEREDA*

# SUSCETTIBILITÀ DEI MONOCITI DI CONIGLIO CD4 NEGATIVI ALL'INFEZIONE DA HIV

Istituto di Clinica delle Malattie Infettive
IRCCS Policlinico S. Matteo, Pavia.
* Istituto di Microbiologia - Università di Pavia.

## INTRODUZIONE

Le prime cellule ad essere infettate dall'HIV sono i linfociti T (1) ed i monociti (2-3-4); questo tropismo virale è determinato dalla presenza del recettore CD4 sulle cellule permissive (1-5-6).

Il recettore CD4 rappresenta il principale recettore per l'HIV; in effetti gli anticorpi anti CD4 sono in grado di bloccare l'infezione da HIV e l'induzione di sincizi (5-7); in aggiunta le cellule non permissive all'HIV diventano suscettibili all'infezione dopo espressione del recettore CD4 sulla membrana. Pauza et al. (8) hanno dimostrato che l'HIV penetra nei linfociti T e nei monociti tramite endocitosi CD4-mediata.

Questa ipotesi è stata dimostrata ultrastrutturalmente mediante l'osservazione di virioni all'interno degli endosomi, laddove la penetrazione e la capacità infettante del virus nelle cellule CD4 positive veniva inibita da un pretrattamento con l'anticorpo monoclonale OKT4A.

Filice *et al.* (1988) (10) hanno recentemente dimostrato che è possibile indurre un'infezione persistente nel coniglio mediante infezione della linea macrofagica-monocitica.

Nei linfo-monociti di coniglio non è stato identificato un recettore omologo del CD4 né alcuna reattività con anticorpi monoclonali OKT4 e OKT4A diretti contro il CD4 (10).

La presente ricerca analizza le modalità di penetrazione e contestuale infezione del virus HIV nei monociti-macrofagi di coniglio (naturalmente CD4 negativi).

L'endocitosi dell'HIV CD4 indipendente è verosimilmente la modalità prevalente di penetrazione ed infezione nei monociti di conigli.

Questa affermazione è supportata dall'osservazione al microscopio elettronico di virioni all'interno di vescicole endosomiali, analogamente a quanto avviene nei linfo-monociti umani CD4 positivi.

L'ingresso via endocitosi non CDA-mediata è altresì in grado di indurre infezione nei monociti-macrofagi di coniglio con integrazione genomica e replicazione di HIV e trasmissibilità del virus a cellule *targets*.

## Materiali e Metodi

### *Monociti-macrofagi di coniglio*

Cellule mononucleate sono state separate dal sangue periferico di coniglio sieronegativo per HIV e coltivate in *Corning flask* ($25 \times 10^6$ cellule per fiasca) con RPMI 1640, con 20% di FCS, 10% di siero di coniglio ed antibiotici.

Dopo 2 giorni sono state rimosse le cellule non aderenti e successivamente le cellule aderenti sono state sottoposte a lisi complemento-mediata delle cellule T mediante anticorpi monoclonali di coniglio pan-T e complemento.

### *Modalità di infezione*

I monociti-macrofagi di coniglio, naturalmente CD4 negativi, alla concentrazione di $1 \times 10^6$ sono stati infettati con 4 ml di surnatante purificato da colture cellulare H9 infettate con HTLV-IIIB contenenti circa $1 \times 10^6$ unità infettanti per ml.

### *Antigene HIV p24*

L'antigene p24 è stato ricercato nel surnatante delle colture cellulari impiegando un *test* ELISA modificato. Per catturare l'antigene si sono utilizzati pozzetti coattati con frazioni di IgG umane positive ad alto titolo per HIV.

Il legame è stato rivelato mediante una miscela di anticorpi monoclonali di topo anti-p24 coniugati con biotina, streptavidina, perossidasi e tetrametilbenzidina.

*Attività della Reverse Transcriptase*

L'attività della R.T. è stata determinata in 10 $\mu$l di surnatante purificato secondo la metodica descritta da Ho e coll. (11-12).

*Amplificazione genica mediante Polymerase Chain Reaction (PCR).*

La PCR (Perkin-Elmer corporation Norwolk, CT) è stata eseguita su DNA genomico estratto da *pellets* cellulari mediante oligonucleotidi complementari alle regioni *gag* dell'HIV.

Aliquote di campioni amplificati sono state sottoposte ad elettroforesi su 3%, Nu-Sieve 1%, Sea Kem Agarose e sottoposta a *Southern Blot* usando un *probe* coniugato specifico per la regione *gag* dell'HIV.

*Microscopia elettronica*

Le colture cellulari di monociti sono state fissate per la microscopia elettronica con una miscela di due parti di glutaraldeide al 2,5% in tampone sodio cacodilato ed una parte di osmio all'1% per 30 minuti.

Quindi sono state risospese in soluzione tampone e quindi poste in una soluzione allo 0,25% di acetato di uranile per 30 min.

Infine i campioni sono stati disidratati in alcool ed inclusi in Epon 812. Sezioni sottili ottenute con ultramicrotomo Reichert OmU3, sono state colorate con citrato di piombo ed acetato di uranile e quindi osservate con un microscopio Philips CM 12 STEM.

*Risultati*

La colorazione negativa con anticorpi monoclonali di coniglio pan-B e pan-T ha evidenziato che le cellule aderenti presenti nelle fiasche erano monociti-macrofagi. Inoltre queste cellule mostravano una attività fagocitaria positiva al *test* delle particelle di latex ed alla colorazione con alfa-naftil acetato esterasi (esterasi non specifica). Nei monociti di conigli, in accordo con altri autori, non si è rilevato un recettore CD4 simile, né è stata altresì evidenziata reattività

impiegando anticorpi monoclonali anti-CD4 umani (OKT4, OKT4A). I monociti di coniglio infettati con HIV liberano una quantità rilevabile di virus evidenziata mediante ricerca dell'antigene p24 dopo 12/15 gg. fino a 28/30 gg. In un ulteriore esperimento sono state infettate con HIV colture di monociti di coniglio. Ogni settimana, per 4 settimane, le colture sono state co-coltivate con cellule H9. Dopo una settimana di co-coltivazione le cellule H9 in sospensione sono state rimosse e poste in colture ricercando la presenza di antigene e l'attività di *reverse transcriptase*. Si è riscontrata la presenza di antigene p24 (più di 2000 pg/ml) e la attività di *reverse transcriptase* dopo 3/4 settimane di coltura. In preliminari esperimenti di amplificazione genica mediante ibridizzazione con *probes* sintetici si sono riscontrate le sequenze geniche dell'HIV nel genoma dei monociti di conigli dopo 2/3 settimane di infezione.

*Microscopia elettronica*

I monociti di coniglio sono stati incubati con 5 ml di surnatante purificato contenente HIV alla concentrazione di $10 \times 10^6$ unità infettanti/ml ad intervalli crescenti.

Sono stati quindi fissati i campioni a 5, 10, 30, 60 minuti. Le modalità di penetrazione del virus all'interno dei macrofagi sono chiaramente dimostrate in Fig. 1.

I campioni osservati dopo 30-60 minuti dall'infezione evidenziavano grandi quantità di virus all'interno dei monociti.

I vacuoli di endocitosi contenevano solamenti il *core* del virus poiché la membrana del vacuolo di endocitosi si era fusa con l'*envelope* del virus (Fig. 4). Le succitate immagini non sono state riscontrate nelle cellule di controllo.

A vari intervalli di tempo (15-30-60 min.) si sono osservati occasionalmente numerosi virioni in un singolo vacuolo che non sembravano interagire con la membrana vacuolare; queste particelle virali presentavano un *envelope* intatto ed un *core* ben definito (Figg. 2-3).

*Discussione*

Nella presente ricerca i monociti-macrofagi di coniglio sono sta-

ti infettati con un ceppo virale, l'HTLV-IIIB (propagato per lungo tempo solo su cellule T CD4 positive) e pertanto dotato di una efficacia infettante circa 70.000 volte più elevata nelle cellule T rispetto alle cellule macrofagiche (2).

Sulla base dei risultati ottenuti sembrerebbe che l'assenza di CD4 nelle cellule macrofagiche di coniglio non impedisca la penetrazione virale e quindi l'infezione.

Il livello di replicazione virale nei monociti di coniglio privi del recettore CD4 risulta molto basso se paragonato alla produzione virale di monociti umani CD4 positivi, e si è potuta rilevare la presenza virale solo dopo amplificazione mediante coltura o subcoltura. In accordo con Kulaga *et al.* (1988) (13), i monociti di coniglio produrrebbero un inibitore della R.T. spiegando così le difficoltà di evidenziazione della attività *reverse transcriptase* in queste cellule infettate. Le nostre ricerche hanno dimostrato che la produzione virale aumenta enormemente dopo co-coltivazione tra i monociti di coniglio infettati e cellule H9 (clone direttamente derivato dalle cellule T4 *helper*).

L'evidenziazione del virus HIV dai monociti ma non dalle cellule T sia di soggetti umani che di coniglio in corso di infezione acuta suggerisce che nelle fasi precoci l'infezione possa essere limitata ai monociti.

Poiché le cellule T *helper* sono le prime cellule T che *in vivo* interagiscono con i macrofagi-monociti dopo che questi hanno fagocitato il virus, è verosimile che l'infezione delle cellule T4 *helper* sia secondaria a quella dei monociti-macrofagi.

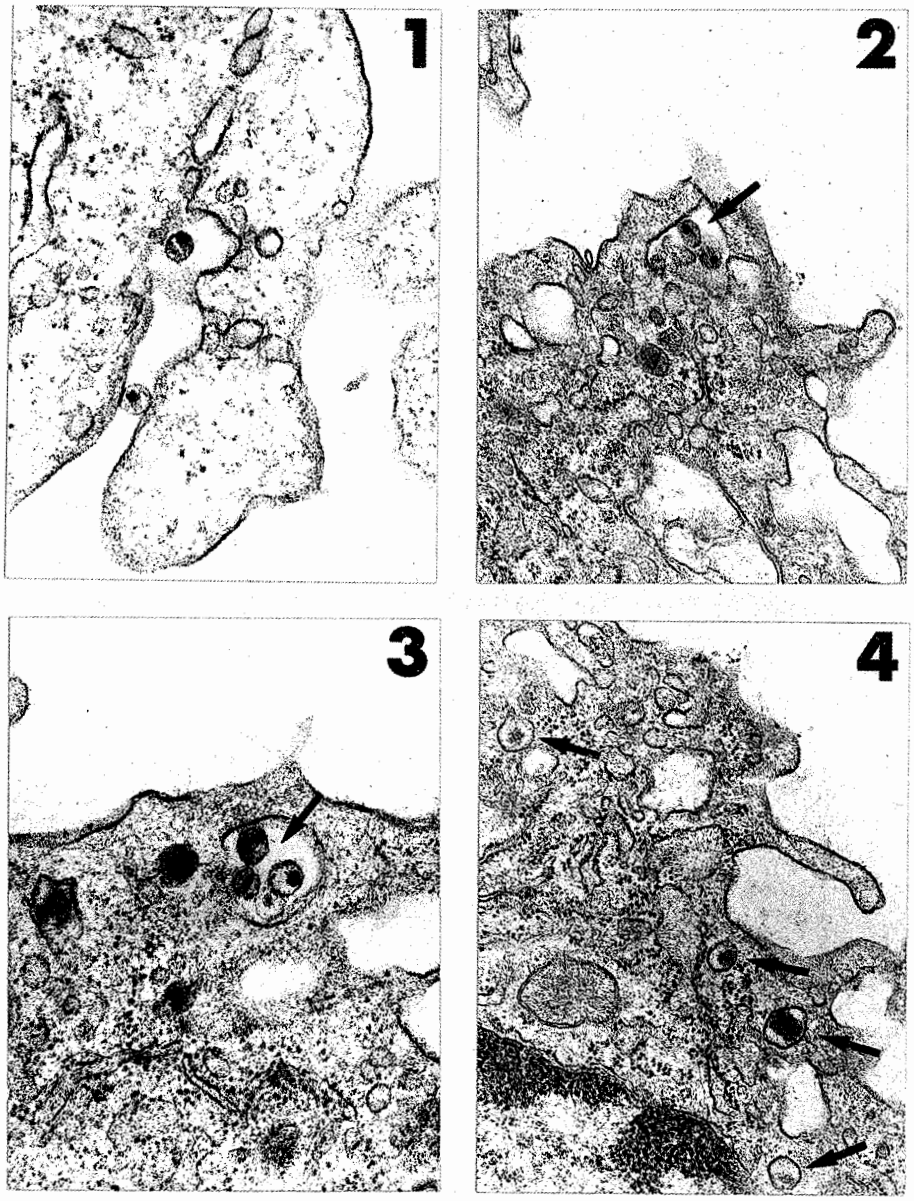
I dati ultrastrutturali qui presentati evidenziano che nei monociti di coniglio "CD4 negativi" la penetrazione del virus avviene mediante endocitosi come confermato dalla presenza di vacuoli di endocitosi contenenti singoli virus completi e vacuoli contenenti solamente il *core* dell'HIV dopo che si è verificata la fusione tra l'*envelope* virale e la membrana endosomiale.

In accordo con Pauza *et al.* (1988) (8), la penetrazione del virus nei monociti di coniglio per fagocitosi, con contestuale presenza di virioni multipli in vacuoli senza fusione tra membrana vacuolare ed *envelope* dell'HIV non sarebbe un processo infettivo.

Sulla base dei risultati ottenuti l'endocitosi CD4 indipendente del-

l'HIV, confermata dalla presenza di vescicole endocitosiche contenenti singoli virus privati dell'*envelope* e contenenti solo il *core* dell'HIV, rappresenta la condizione necessaria per determinare l'insorgenza dell'infezione nei monociti di coniglio.

Il ruolo centrale dei monociti-macrofagi nell'infezione sperimentale del coniglio è ulteriormente supportato da dati sperimentali *in vivo* inerenti l'infezione sperimentale da HTV indotta dopo iperstimolazione e contestuale infezione con HIV-1 di macrofagi-monociti peritoneali (9).




Per l'interpretazione delle figure si veda il testo al paragrafo «Microscopio elettronico»

# BIBLIOGRAFIA

1. KLATZMANN D., BARRÈ SINOUSSI F., NUGEYRE M.T., DAUGUET C., VILMER E., GRISCIELLI C., MONTAGNIER L., Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science, 225:* 59 (1984).

2. GARTNER S., MARKOVITS P., MARKOVITS D.M., KAPLAN H.M., GALLO R.C., POPOVIC M., The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science 233:* 215-219 (1986).

3. HO D.D., ROTA T.R., HIRSCH M.S., Infection of human moncyte/macrophages by human T-lymphotropic virus type III. *J. Clin. Invest., 77:* 1712-1715 (1986).

4. NICHOLSON J.K.A., CROSS G.D., CALLAWAY C.S., MCDOUGAL J.S., In vitro infection of human moncytes with human T lymphotropic virus type III/lymphoadenopathy-associated virus (HTLV-III/LAV) *J. Immunol. 137:* 323-329 (1986).

5. DALGLEISH A.G., BEVERLY P.C.L., CLAPHAM P.R., CRAWFORD D.H., GREAVES M.F. AND R.A. WEISS. The CD4 (T4) antigen is an essential components of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature 312:* 763-767 (1984).

6. MADDON P., DALGLEISH A., MCDOUGAL J., CLAPHAM P., WEISS R., AND AXEL R. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell, 47:* 333-348 (1986).

7. MCDOUGAL J. et al. *Science 231,* 382 (1986).

8. PAUZA C.D., PRICE T.M. HIV infection of T cells and monocytes proce via recepto-r-mediated endocytosis. *The Journal of Cell Biology. 107:* 959-968 (1988).

9. FILICE G., CEREDA P.M., VARNIER O., Infection of rabbit with human immunodeficiency virus. *Nature 335:* 366 (1988).

10. GORDON M.N., KINDT T.J., Rabbit immune system. Encyclopedia of Immunology (J.M. Roit, P.J. Delves Editors) *W.B. Sanders Co. London* (1989) p. 1-8.

11. HO D.D., SCHOOLEY R.T., ROTA T.R., KAPLAN C.J., FLYNN T., SALAHUDDIN S.Z., GONDA M.A., HIRSCH M.S., HTLV-III in the semen and blood of healthy homosexual man. *Science 226:* 451-453 (1984).

12. HO D.D., ROTA T.R., HIRSCH M.S., Infection of human endothelian cells by human T-lymphotrophic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa 81:* 7588-7590 (1984).

13. KULAGA H., FOLKS T., RUTLEDGE R., TRUEKENMILLER M.E., GUGEL E., KINDT T.J., Infection of rabbit with human immunodeficiency virus I. *J. Exp. Med. 169:* 321-326 (1989).

M. BENDINELLI

# MODELLI MURINI DI AIDS*

Dipartimento di Biomedicina, Sezione di Virologia, Università di Pisa

## INTRODUZIONE

I primi studi sulle proprietà immunosoppressive dei retrovirus sono stati condotti con i sierotipi murini di questa grande famiglia di virus. Nel 1959 Old e coll. notarono che topi infettati con il *Friend Leukemia Complex* (FLC) mostravano una risposta immunitaria ridotta. Nel 1963 Peterson e coll. riportarono il primo esperimento sistematico in questo campo, descrivendo gli effetti immunosoppressivi del *Moloney Leukemia Virus*. L'argomento è stato in seguito approfondito dal nostro gruppo, così come da altri.

Lo scopo principale degli studi preliminari era quello di stabilire se l'effetto immunodepressivo dei retrovirus oncogeni fosse un prerequisito per la piena espressione del loro potenziale oncogeno. Mentre le risposte a questo tipo di domanda sono ancora incerte (Bendinelli *et al.*, 1985), questi studi hanno fornito una notevole quantità di informazioni sulla fenomenologia e sui meccanismi delle immunodeficienze indotte dai retrovirus, che sono state di grande aiuto nelle ricerche sull'eziologia e sulla patogenesi dell'AIDS.

Sebbene l'elenco dei retrovirus murini che sicuramente inducono effetti immunosoppressivi si sia allungato in modo impressionante in questi ultimi anni (Tab. 1), l'FLC resta il modello murino, e forse animale, di immunosoppressione da retrovirus più estesamente studiato. Infatti, la sindrome da immunodeficienza causata dall'FLC ha molti vantaggi: 1) colpisce un animale ospite il

*Comunicazione tratta dalla Rassegna "*Friend Leukemia Complex Infection of Mice as an Experimental Model for AIDS Studies*" pubblicata da: E. Soldaini, D. Matteucci, M. Lopez-Cepero, S. Specter, H. Friedman e M. Bendinelli in *Veterinary Immunology and Immunopathology* (1989), *21*, 97-110.

**Tab. 1: Retrovirus murini che sicuramente causano immunosoppressione negli ospiti infetti**

| Retrovirus cronici | Retrovirus acuti |
|---|---|
| *AKR leukemia virus* | *Abelson leukemia complex* |
| *Cas leukemia virus* | *Friend leukemia complex* |
| *Friend leukemia virus* | *Moloney sarcoma virus* |
| *Graffi leukemia virus* | *Rauscher leukemia complex* |
| *Gross leukemia virus* | |
| *LP-BM5 leukemia virus* | |
| *Moloney leukemia virus* | |
| *Radiation leukemia virus* | |
| *Rich leukemia virus* | |
| *Urethane leukemia virus* | |
| *334C leukemia virus* | |
| Virus del tumore mammario | |

cui sistema immunitario è conosciuto nel dettaglio, e che può essere facilmente manipolato; 2) è rapido nell'insorgenza e nella progressione; 3) è estremamente grave; 4) permette di confrontare gli effetti immunosoppressivi dell'intero complesso virale con quelli dei retrovirus cronici che vi fungono da *helper*; 5) ha interessanti analogie con l'AIDS.

## IL SISTEMA MODELLO

Esistono due ceppi principali di FLC che differiscono per il fatto che uno induce anemia e l'altro policitemia. Entrambi i ceppi consistono di un retrovirus acuto difettivo (*spleen focus forming virus,* SFFV) e di un virus *helper* che induce leucemia, cronico ed è replicazione-competente (F-MuLV). L'SFFV è responsabile delle variazioni ematologiche e delle eritroblastosi ed eritroleucemia a rapida evoluzione della milza, che si sviluppano, in topi adulti sensibili, alcuni giorni dopo l'inoculazione dell'intero complesso virale. Al contrario, l'infezione con il solo virus *helper*, che può facilmente diffondere come entità indipendente, induce una prima leggera

iperplasia della milza e leucemie di vario isotipo in un periodo di latenza di alcuni mesi (Bendinelli e Nardini, 1973a; Weiss *et al.*, 1985).

L'FLC e le cellule trasformate dall'FLC sono stati oggetti di molti studi riguardanti la leucemogenesi, la differenziazione cellulare e altri aspetti di base della biologia cellulare, mentre il ciclo vitale del virus nell'ospite infetto è stato studiato meno. Comunque, si sa che i virus dell'FLC si replicano in molti tipi cellulari, quali i macrofagi (Toniolo *et al.*, 1980), i linfociti B e, in grado minore, nei linfociti T (Cerny *et al.*, 1976). Ulteriori informazioni sulla biochimica e sulla biologia dei virus dell'FLC possono essere trovate, ad esempio, nel testo edito da Weiss *et al.* (1985).

## EFFETTI IMMUNOSOPPRESSIVI

La Tab. 2 riassume gli effetti dell'FLC sui parametri immunologici dei topi BALB/c, che possono essere considerati il prototipo dei ceppi murini sensibili (per quanto si sa finora, gli effetti immunosoppressivi dei due ceppi dell'FLC non differiscono). In altri ceppi murini, tutti o solo alcuni cambiamenti possono essere meno evidenti o assenti. La correlazione fra la sensibilità dell'ospite alla leucemogenesi e l'immunosoppressione da FLC è stretta ma non assoluta. Una depressione della risposta immunitaria è stata anche osservata in topi infetti resistenti alla leucemia, sebbene il difetto sia generalmente transitorio e leggero (soprattutto per quanto riguarda l'immunità cellulo-mediata), quando confrontato con gli effetti rilevati in animali sensibili alla leucemia (Ceglowski e Friedman, 1969; Specter e Friedman, 1978). Infatti, la sensibilità all'immunodepressione da FLC sembra essere controllata non solo dai *loci* che regolano la leucemogenesi, ma anche da geni indipendenti (Morrison *et al.*, 1986). In base al ruolo suggerito per le interazioni virali dirette con gli immunociti nella genesi dell'immunosoppressione, i geni che controllano la replicazione virale nei tipi cellulari specifici possono rappresentare i determinanti chiave.

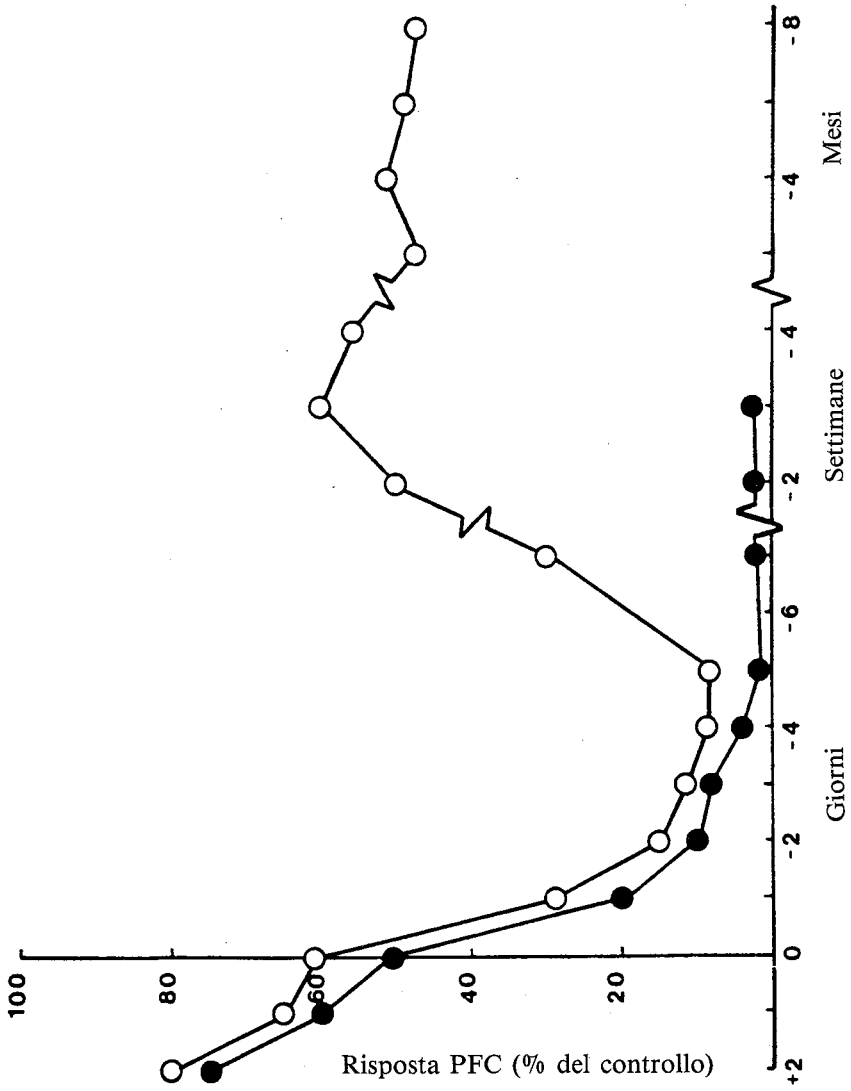
Il genotipo dell'ospite non è l'unica variabile conosciuta che influisce sul grado di immunosoppressione. Altri fattori includono

la dose di virus utilizzata per l'infezione, la natura e la dose dell'antigene immunizzante e il calcolo del tempo di infezione relativo alla immunizzazione *challenge*. Anche la via di somministrazione dell'antigene è importante, dato che la milza è il bersaglio principale per entrambe le attività leucemogenica e immunosoppressiva dei virus dell'FLC (Bendinelli *et al.*, 1985).

Molte delle anormalità immunitarie indotte dall'intero complesso virale sono riproducibili infettando dei topi con il solo F-MuLV. L'F-MuLV rappresenta il 90-99% dell'infettività virale della preparazione di FLC ed, inoltre, gioca probabilmente un ruolo importante negli effetti immunodepressivi così come in altri aspetti della patogenesi dell'FLC (Jones *et al.*, 1988). Esistono, tuttavia, alcune differenze notevoli. Per esempio, mentre la depressione della risposta anticorpale da FLC diventa più grave con l'aumentare del periodo post-infezione (p.i.), quella causata dall'F-MuLV raggiunge il culmine 2 settimane dopo l'infezione, e quindi diminuisce gradatamente fino a lasciare una capacità di risposta pari alla metà del normale livello, per la vita degli animali infetti (Fig. 1) (Bendinelli e Nardini, 1973b). Anche la risposta immunitaria cellulo-mediata è colpita in misura minore dall'F-MuLV rispetto all'FLC. I topi infettati con F-MuLV presentano, tuttavia, un'anomala sensibilità ai batteri e ai virus superinfettanti (Bendinelli *et al.*, 1986a).

**Tab. 2: Funzioni immunitarie depresse in topi BALB/c infettati da FLC**

| |
|---|
| Risposta anticorpale primaria e secondaria |
| Maturazione immunologica età-dipendente |
| Ipersensibilità ritardata |
| Sensibilità da contatto |
| Risposta citotossica mediata dalle cellule T |
| Rigetto dei trapianti |
| Resistenza alle superinfezioni |
| Resistenza ai trapianti di tumori |




○ topi infettati con FLC
● topi infettati con F-MuLV

Figura 1. Capacità di produrre anticorpi da parte di cellule di milza di topi infettati con FLC o F-MuLV. La risposta è espressa come percentuale del controllo (da Bendinelli e coll., 1985).

## DISFUNZIONI DELLE CELLULE IMMUNOCOMPETENTI

Gli immunociti dei topi infetti da FLC e da F-MuLV sono stati ampiamente studiati in un gran numero di esperimenti, condotti *in vivo* e *in vitro*, nel tentativo di definire con precisione le alterazioni cellulari responsabili della sindrome da immunodeficienza. La Tab. 3 riassume i cambiamenti quali/quantitativi descritti nelle cellule immunocompetenti dei topi infetti da FLC. Ovviamente, l'immunodeficienza indotta dai virus dell'FLC è un fenomeno complesso che coinvolge molti tipi cellulari del sistema immunitario. Sebbene non si possa escludere che alcuni di tali cambiamenti siano secondari agli effetti di diluizione causati dalle cellule che proliferano in modo abnorme, la maggior parte di questi si sviluppa prima di una qualsiasi crescita tumorale significativa ed è anche causata dall'F-MuLV induttore di leucemia tardiva. In base a ciò, i recenti studi di citometria a flusso su cellule spleniche, 2 settimane dopo l'infezione da FLC, hanno chiaramente evidenziato una drastica diminuzione della sottopopolazione di linfociti T *helper* (L3T4), ma un calo moderato della sottopopolazione di linfociti T *suppressor*/citotossici (Lyt2) (Lopez-Cepero *et al.*, 1988a), e una variazione delle cellule spleniche che non può essere spiegata unicamente dalla diluizione cellulare.

I dati riassunti nella Tab. 3 hanno, tuttavia, alcune grosse limitazioni.

Innanzitutto, è stato impossibile stabilire se i singoli cambiamenti osservati siano dovuti ad un difetto intrinseco del tipo cellulare apparentemente infetto o, piuttosto, rispecchino alterazioni degli elementi cellulari interreagenti nei circuiti immunitari effettori o regolatori. Ad esempio, in molte infezioni retrovirali il difetto cellulare responsabile della ridotta risposta dei linfociti ai mitogeni per i T e i B è stato individuato al di fuori delle cellule *responder* (Bendinelli *et al.*, 1985). In secondo luogo, non si sa ancora quali siano i cambiamenti critici per la genesi dello stato di immunodepressione e quali siano, invece, gli effetti non essenziali. Ma la domanda più importante, che non ha ancora risposta, è cosa li causa. La spiegazione più probabile è che le disfunzioni cellulari siano dovute direttamente alla replicazione virale nelle cellule colpite. Noi abbia-

**Tab. 3: Disfunzioni degli immunociti splenici nell'infezione da FLC**

| Cellule T |
|---|
| Diminuzione |
| Alterata circolazione |
| Ridotta espressione degli antigeni di differenziazione |
| Ridotta proliferazione antigene-dipendente |
| Ridotta proliferazione mitogeno-dipendente |
| Ridotta produzione di mediatori solubili |
| Ridotta capacità di mediare effetti allogenici |
| Ridotta risposta a mediatori solubili |
| **Cellule B** |
| Ridotta produzione anticorpale |
| Ridotta proliferazione mitogeno-dipendente |
| Ridotta espressione delle Ig di superficie |
| Ridotto *capping* delle Ig di superficie |
| Capacità di sopprimere la risposta anticorpale delle cellule spleniche normali |
| Attivazione policlonale |
| **Macrofagi e altre cellule accessorie** |
| Ridotta capacità di diffondersi sulle superfici |
| Ridotta mobilità *in vitro* |
| Ridotto accumulo nei focolai infiammatori |
| Ridotta distruzione dei batteri ingeriti |
| Ridotta citotossicità anticorpo-dipendente |
| Aumentata stimolazione dell'eritropoiesi |
| Ridotta capacità di cooperare con i linfociti |
| Aumentata inibizione dell'attività delle cellule NK |

mo evidenziato chiaramente che il difetto delle funzioni accessorie dei macrofagi è di importanza fondamentale, per lo meno nell'immunosoppressione osservata durante i primi stadi dell'infezione (Bendinelli *et al.*, 1975; Specter *et al.*, 1978). Dal momento che i

macrofagi sono fra le prime cellule che si infettano con i virus dell'FLC (Toniolo *et al.*, 1980), il loro difetto potrebbe essere il diretto risultato della replicazione virale. E' interessante notare che le anomalie dei macrofagi e di altre cellule accessorie sono riconosciute sempre più come fattori cruciali nell'alterazione immunitaria associata a HIV, che si sviluppa anche in questo tipo cellulare (Ho *et al.*, 1987; Spickett e Dalgleish, 1988). Una tale spiegazione, tuttavia, non sembra essere valida per le disfunzioni degli altri immunociti indotte dai virus dell'FLC, dal momento che si è visto che cellule B infette in modo produttivo rilasciano una quantità normale di anticorpi (Koo *et al.*, 1971). Quindi, sembra probabile che altri meccanismi indiretti di danno immunitario siano innescati dai virus dell'FLC.

## ALTERAZIONI DELLA PRODUZIONE E DELLA REATTIVITÀ ALLE INTERLEUCHINE

Precedenti studi avevano dimostrato che le cellule spleniche di topi infetti da FLC producono quantità ridotte del fattore che inibisce la migrazione dei macrofagi (Mortensen *et al.*, 1973). Più recentemente, abbiamo svolto uno studio sistematico degli altri mediatori solubili, in considerazione del loro possibile contributo nei meccanismi di immunosoppressione indotti dai virus dell'FLC nei topi BALB/c sensibili (Lopez-Cepero *et al.*, 1988a, b; Matteucci *et al.*, 1988).

Un aumento significativo della produzione di IL-1 da parte dei macrofagi splenici infetti, stimolati con endotossine batteriche (LPS), è stato osservato in molti ma non in tutti gli esperimenti. La ragione di questa incostanza non è chiara, ma una maggior produzione di IL-1 è stata osservata in altre condizioni associate a una ridotta risposta immunitaria, compresi i soggetti infetti da HIV (Bowen *et al.*, 1986), nei quali questa potrebbe rappresentare un tentativo di compensare la ridotta reattività dei tipi cellulari interreagenti. Nel complesso, tuttavia, l'omeostasi dell'IL-1 risultava sostanzialmente risparmiata (Tab. 4). Anche l'espressione dell'attivi-

**Tab. 4: Parametri di IL-1 in milze infette da FLC e da F-MuLV**[1]

| Virus usato per l'infezione: | FLC | | F-MuLV | |
|---|---|---|---|---|
| Giorni dall'infezione | 6-10 | 14-21 | 6-10 | 14-21 |
| Produzione spontanea di IL-1: | | | | |
| -milza *in toto* | no[2] | no | no | no |
| -cell. aderenti | no | no | no | no |
| Produzione di Il-I indotta da LPS: | | | | |
| -milza *in toto* | — | — | — | — |
| - cell. aderenti | -/+ | -/+ | -/+ | -/+ |
| Assorbimento di IL-1 | — | — | n.d. | n.d. |
| Risposta proliferativa a IL-1[3] | — | — | n.d. | n.d. |
| Soppressione dell'attività di IL-1[4] | no | no | no | no |
| Espressione di IL-1 sulla membrana dei macrofagi | — | n.d. | — | n.d. |
| Effetti di IL-1 sulla risposta anticorpale[5] | no | no | no | n.d. |
| Effetti di IL-1 sulla risposta ai mitogeni[6] | no | no | no | n.d. |

[1] da: Lopez-Cepero *et al.*, 1988b; Matteucci *et al.*, 1988
[2] no = non valutabile; — = invariato; + = aumentato; n.d. = non determinato
[3] comprese le cellule timiche
[4] capacità delle cellule infette di sopprimere la normale proliferazione dei timociti in risposta a IL-1 esogena
[5] risposta anticorpale agli eritrociti di pecora
[6] risposta proliferativa alla ConA

tà IL-1 simile membrana-associata da parte dei macrofagi stimolati con LPS, che è almeno in parte regolata in modo diverso rispetto all'IL-1 solubile, rimaneva nel normale *range*. E' stato riportato che un peptide sintetico, analogo alle proteine dell'*envelope* dei retrovirus, inattiva l'IL-1 (Kleinerman *et al.*, 1987), ma noi non abbiamo rilevato inibitori dell'attività dell'IL-1 prodotta dalle cellule infette.

Abbiamo inoltre esaminato la capacità degli LPS di indurre la produzione di interferone (IFN) da parte delle cellule spleniche infette. Gli splenociti murini, stimolati *in vitro* con LPS, rilasciano $\alpha$ e $\beta$-IFN, prodotto soprattutto dai macrofagi e dalle cellule B du-

rante le prime ore di incubazione (Blanchard *et al.*, 1986). I risultati hanno mostrato che la produzione di $\alpha$ e $\beta$-IFN non era modificata in modo significativo, almeno durante le prime 2 settimane p.i. (risultati non pubblicati). Nel complesso questi risultati suggeriscono che sia le risposte afferenti sia quelle efferenti, che coinvolgono le monochine studiate, non sono alterate in maniera notevole dall'infezione da FLC.

Al contrario, l'attività linfochino-producente dei linfociti T è notevolmente danneggiata dall'infezione. La produzione di IL-2 da parte delle cellule spleniche attivate dalla lectina risultava fortemente ridotta negli stadi precoci p.i. (Tab. 5). I cambiamenti della produzione di $\gamma$-IFN ricordavano quelli dell'IL-2 suggerendo l'esistenza di un difetto generalizzato a questo livello (risultati non pubblicati). Ancor più importante, la cinetica della riduzione nella produzione di IL-2 era paragonabile alla depressione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata e dell'attività delle cellule *natural killer* (NK) osservata nei topi infetti (Bendinelli *et al.*, 1985). Nel caso dell'FLC, il *deficit* diventava progressivamente più grave nel tempo, cosicché dalla terza settimana p.i. la produzione di IL-2 era quasi completamente scomparsa. Nel caso dell'F-MuLV, mentre a 1 settimana p.i. la produzione di IL-2 era ridotta come negli animali infetti da FLC, i livelli in seguito rimanevano a circa la metà di quelli normali, indipendentemente dal tempo trascorso.

Questa differenza non sembra essere dovuta solo alla rapida proliferazione delle cellule anomale, che avviene negli animali infetti da FLC ma non in quelli infetti da F-MuLV. Gli esperimenti di separazione cellulare e altri studi hanno mostrato che la soppressione tardiva della produzione di IL-2 da parte dell'FLC non era dovuta solo alla presenza di cellule tumorali. Infatti, il frazionamento secondo Percoll delle cellule spleniche da topi infetti da FLC ha identificato in modo chiaro la popolazione di linfociti Lyt-1.2 positivi come il bersaglio colpito (Lopez-Cepero *et al.*, 1988a). Tuttavia, non è possibile per ora escludere che le cellule tumorali residue o i fattori soppressivi solubili provenienti dalle cellule tumorali producenti il virus o dalle cellule linfoidi siano i mediatori della soppressione della produzione di IL-2.

Infatti, dalle 2-3 settimane p.i. le cellule tumorali producenti il

**Tab. 5: Parametri di IL-2 in milze infette da FLC e da F-MuLV[1]**

| Virus usato per l'infezione: | FLC | | F-MuLV | |
|---|---|---|---|---|
| Giorni dall'infezione | 6-10 | 14-21 | 6-10 | 14-21 |
| Produzione di IL-2: | | | | |
| -di base | no[2] | no | no | no |
| -indotta da ConA | xx | xxx | xx | xx |
| Soppressione della produzione di IL-2[3] | no | + | no | + |
| Assorbimento di IL-2 | | | | |
| - di base | + | + | — | — |
| - indotto da ConA | — | — | — | — |
| Risposta proliferativa a IL-2 | — | — | n.d. | n.d. |
| Soppressione dell'attività di IL-2[4] | + | + | + | + |
| Effetti di IL-2 sulla risposta anticorpale[5] | no | no | no | n.d. |
| Effetti di IL-2 sulla risposta ai mitogeni[6] | no | no | no | n.d. |
| Effetti di IL-2 sulla leucemogenesi *in vivo*[7] | no | no | n.d. | n.d. |

[1] da: Lopez-Cepero *et al.*, 1988b; Matteucci *et al.*, 1988
[2] no = non valutabile; — = invariato; + = aumentato; x = diminuito; n.d. = non determinato
[3] capacità delle cellule infette di sopprimere la produzione di IL-2 da parte delle normali cellule spleniche
[4] capacità delle cellule infette di sopprimere la proliferazione delle cellule CTLL-2 in risposta a IL-2 esogena
[5] risposta anticorpale agli eritrociti di pecora
[6] risposta proliferativa alla ConA
[7] IL-2 somministrata giornalmente dal giorno 0 al 14° p.i., alla dose di 5 x $10^4$ U/topo. Milze pesate al 15° giorno.

virus nella milza dei topi infetti da FLC acquistavano la capacità di inibire la proliferazione e la produzione di IL-2 delle cellule T provenienti da topi normali (Fig. 2).

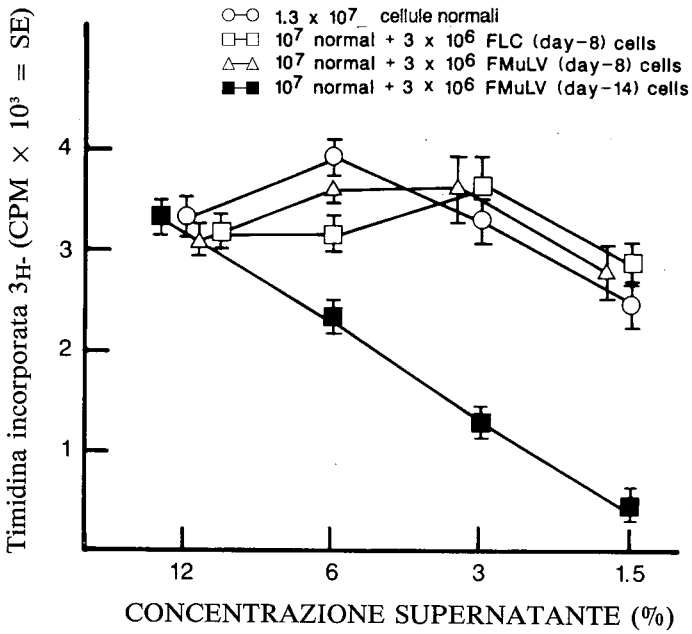



Figura 2. Effetti dell'aggiunta di cellule infettate con FLC o F-MuLV sulla produzione di IL-2 da parte di cellule spleniche normali. Le miscele di cellule indicate sono state incubate con 2 mg/ml di Concanavalina A per 24 ore. I surnatanti sono stati saggiati per la presenza di IL-2 su cellule CTTL-2 alle concentrazioni indicate (da Matteucci e coll., 1989).

L'attività era associata alle frazioni della membrana cellulare ma non alle frazioni solubili, ed era inibita dal trattamento con anticorpi monoclonali diretti contro la proteina transmembrana retrovirale p15E (Lopez-Cepero *et al.*, 1988a). Quest'ultimo dato suggerisce che la soppressione potrebbe essere mediata da questo prodotto virale. Sebbene l'aggiunta *in vitro* di virus non influisca sulla produzione di IL-2 e sulla risposta delle normali cellule spleniche, la soppressione delle funzioni linfocitarie indotta dai retrovirus, compresa la produzione di IL-2, è stata ottenuta distruggendo o inattivando con i raggi UV i virus e le preparazioni di proteine strutturali dei virioni (Fowler *et al.*, 1977; Copelan *et al.*, 1983; Pahwa *et al.*, 1985).

Le cellule spleniche infette da FLC e da F-MuLV sopprimevano anche la risposta proliferativa all'IL-2 della linea cellulare CTLL-2

IL-2 dipendente. Quest'effetto si ottiene con la presenza di cellule spleniche aderenti, il che indica che potrebbero essere coinvolti i macrofagi. Inoltre, questa veniva solo in parte ripristinata aumentando la dose di IL-2 aggiunta e non poteva essere riprodotta col solo virus o con il surnatante di cellule infette. È interessante notare che nel primo periodo p.i. le cellule spleniche assorbivano maggiori quantità di IL-2 ma non mostravano una maggior proliferazione in risposta all'aggiunta di IL-2 esogena. Questo suggerisce che i linfociti T dei topi infetti subiscano una sorta di attivazione "sterile", per cui l'IL-2 è consumata ma non porta a proliferazione cellulare. Questo effetto era transitorio, dal momento che a 2 settimane p.i. le cellule spleniche assorbivano ancora quantità normali di IL-2, ma questo potrebbe essere importante dato che qualsiasi cambiamento che avviene all'inizio dell'infezione è diretto ad influenzare in modo critico il risultato dell'infezione stessa. Inoltre, non è stato possibile indurre i recettori per l'IL-2 nei topi infetti da FLC dopo 3-4 settimane dall'infezione (risultati non pubblicati).

Alterazioni dell'omeostasi dell'IL-2 sono state segnalate in un certo numero di esperimenti condotti con retrovirus *in vivo* e *in vitro* (Copelan *et al.*, 1983; Orosz *et al.*, 1985). Di particolare importanza sono le alterazioni descritte in pazienti infetti da HIV in modo sintomatico e asintomatico (Bowen *et al.*, 1986; Borzy, 1987; Gupta *et al.*, 1987; Ho *et al.*, 1987; Spickett e Dalgleish, 1988). I nostri dati hanno confermato che, *in vivo*, i retrovirus causano dei notevoli sconvolgimenti negli eventi correlati all'IL-2 e hanno mostrato che questo avviene subito dopo l'infezione. Il meccanismo che è alla base di questo resta però poco chiaro. L'alterata omeostasi dell'IL-2 potrebbe essere il risultato della diretta inibizione dei linfociti produttori oppure, indirettamente, del difetto di altri tipi cellullari associati alla fisiologia dell'IL-2. In studi recenti, l'uso di diversi induttori ha mostrato che, durante le prime fasi dell'infezione, la ridotta capacità di produrre IL-2 può essere superata combinando insieme un trattamento con lo ionoforo $Ca^{++}$ A23187 e uno con il *promoter* tumorale TPA (Tab. 6), il che suggerisce che una deficienza dell'attività della protein-chinasi C delle cellule T infette potrebbe mediare questo difetto, almeno in parte.

**Tab. 6: Produzione di IL-2 da cellule spleniche di topi infetti da FLC dopo stimolazione con diversi induttori.**

| Induttore | Giorni dall'infezione | |
|---|---|---|
| | 6-10 | 14-21 |
| Concanavalina A | xx[2] | xxx |
| Lipopolisaccaridi batterici | xx | xxx |
| Enterotossina B di stafilococco | xx | xxx |
| Ionoforo $Ca^{++}$ A23187 + TPA[1] | — | xx |

[1] TPA = 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato
[2] — = invariato; x = diminuito

È un elemento essenziale nella reazione a cascata delle linfochine implicate nel dare inizio a una grande varietà di risposte immunitarie cellulari e umorali, ma il significato delle aberrazioni dell'omeostasi dell'IL-2 nella genesi delle immunodepressioni da retrovirus è problematico. Sebbene sembri possibile che queste aberrazioni contribuiscano ed amplifichino i cambiamenti cellulari discussi nel precedente paragrafo, non si può escludere la possibilità che queste siano solo un'ulteriore manifestazione dell'immunosoppressione senza un ruolo più importante nella sua genesi.

## PREVENZIONE E TRATTAMENTO

Come già detto, F-MuLV produce una forma di immunosoppressione più leggera rispetto a quella indotta dall'intero complesso virale. Una pre-infezione con F-MuLV protegge non solo nei confronti dell'azione leucemogenica dell'FLC, ma anche nei confronti dei suoi gravi effetti immunosoppressivi (Bendinelli e Nardini, 1973a). Un soddisfacente grado di protezione è stato ottenuto anche immunizzando i topi con FLC trattato con formalina (risultati non pubblicati). Questi risultati hanno dimostrato la possibilità di vaccinare contro le immunodeficienze retrovirali. Bisogna però notare che i virus dell'FLC non hanno mostrato quelle marcate variazioni antigeniche caratteristiche dell'HIV.

Tuttavia, molte manipolazioni da noi condotte si sono dimostrate capaci di risolvere o di alleviare lo stato di immunosoppressione indotto dai virus dell'FLC. Per esempio, la somministrazione di macrofagi singenici provenienti da topi normali ha ristabilito quasi completamente la risposta anticorpale dei topi infetti da F-MuLV, anche se gli effetti sull'infezione da FLC sono stati molto meno pronunciati o assenti. Quando supplementate con macrofagi normali *in vitro*, anche le cellule spleniche di topi infetti da FLC riacquistano una notevole reattività anticorpale (Specter *et al.*, 1978).

Sia *in vivo* che *in vitro* questa reintegrazione richiedeva un numero relativamente basso di macrofagi, il che suggerisce l'intervento di meccanismi o fattori di amplificazione.

Un altro trattamento che ha portato ad un notevole ripristino della risposta immunitaria è consistito nell'inoculazione di LPS provenienti da varie specie batteriche e di derivati selezionati atossici, a tempi appropriati relativi all'immunizzazione (Friedman *et al.*, 1988). Gli LPS hanno aumentato la produzione di cellule spleniche produttrici di anticorpi ad un livello più alto negli animali infetti che non in quelli di controllo.

L'effetto è stato più evidente negli animali resistenti alla leucemia, ma è stato anche ben evidente nei topi BALB/c.

Quando gli esperimenti sono stati ripetuti *in vitro* aggiungendo gradualmente, alle colture di cellule spleniche infette, dosi di LPS, l'aumento della risposta anticorpale è stato ancor più evidente che *in vivo*. Gli esperimenti dose-dipendenti condotti *in vitro* hanno indicato che dosi troppo basse per indurre un effetto mitogeno valutabile erano ancora capaci di risolvere lo stato di immunosoppressione delle cellule spleniche infette, suggerendo quindi che l'effetto non era necessariamente correlato alla mitogenicità degli LPS per le cellule B.

La prova, discussa ampiamente altrove (Bendinelli *et al.*, 1986b) ha dimostrato che l'azione ripristinante degli LPS era, almeno in parte, mediata dai macrofagi. Noi abbiamo inoltre esaminato la possibilità che fossero coinvolti dei fattori solubili rilasciati da queste cellule. Quindi, surnatanti, condizionati da macrofagi normali splenici o peritoneali, stimolati dagli LPS, erano parimenti efficaci o anche più efficaci degli LPS stessi. L'effetto di tali surnatanti si

è dimostrato resistente alla polimixina B, indicando quindi che questo non è stato un artefatto dovuto al trasporto o al rilascio di LPS ingeriti dai macrofagi.

Al momento è, tuttavia, impossibile trarre ferme conclusioni sul fatto se i benèfici effetti degli LPS siano mediati solo dai macrofagi e dai fattori prodotti da queste cellule. Gli LPS hanno un sorprendente *range* di attività e possono influenzare altri tipi cellulari immunitari colpiti dai virus dell'FLC. L'induttore di IFN *statolon* si è anch'esso mostrato capace di ripristinare le funzioni immunitarie degli animali infetti da FLC (Wheelock *et al.,* 1974). Sarebbe però interessante verificare se i macrofagi provenienti da donatori infetti possano crescere in coltura, essere guariti dall'infezione, stimolati con LPS e, quindi, reinoculati nei donatori per alleviare l'immunosoppressione o proteggere nei confronti di patogeni superinfettanti. Malgrado le considerevoli alterazioni dell'omeostasi dell'IL-2, osservate nei topi infetti, le colture di cellule spleniche addizionate di IL-2 purificata, sola o in combinazione con IL-1, non sono riuscite a ripristinare la risposta anticorpale e quella proliferativa mitogeno-dipendente (Matteucci *et al.,* 1988). Ci sono dati contrastanti sulla capacità dell'IL-2 di correggere *in vitro* l'immunosoppressione indotta dai retrovirus. Tuttavia, i nostri risultati concordano con i falliti tentativi di alleviare l'AIDS e i relativi cambiamenti dei linfociti con la somministrazione di IL-2 (Lotze, 1985). Tali fallimenti potrebbero indicare che la deplezione di questo mediatore non è il solo fattore responsabile della risposta alterata. Gli attuali studi sull'effetto del trattamento combinato con altre citochine e/o agenti antivirali potrebbero risultare interessanti a questo scopo. Un recente lavoro suggerisce che il fattore di necrosi tumorale, che mima molti effetti degli LPS, possa avere un valore terapeutico negli animali infetti da FLC (Johnson e Furmanski, 1987).

## CONCLUSIONI

C'è un urgente bisogno di modelli animali idonei con caratteristiche simili all'infezione da HIV dell'uomo. L'infezione da FLC

è il modello animale di immunosoppressione retrovirale più ampiamente studiato, e ha fornito importanti informazioni per capire il meccanismo generale con cui i retrovirus riescono a indurre una riduzione della risposta immunitaria nell'ospite infetto. Sebbene non sia possibile soddisfare completamente il bisogno di adatti modelli per l'AIDS (Desrosiers e Letvin, 1987), ulteriori studi su questo sistema possono ancora fornire informazioni utili in molte aree della ricerca sull'AIDS. Al momento noi ci siamo focalizzati sulle seguenti aree di estremo interesse:

1) raggiungere una miglior conoscenza dei meccanismi di base secondo i quali i retrovirus persistono e immunodeprimono l'ospite.

L'immunosoppressione indotta dall'FLC è un fenomeno complesso che coinvolge molteplici funzioni di molti tipi cellulari del sistema immunitario: quindi, sapere come si producono tali alterazioni può essere importante per l'AIDS, che è anch'esso il risultato del danno retrovirale di molti tipi cellulari immunocompetenti;

2) valutare se, a quale livello e come, dei cofattori, che si sospetta facciano precipitare le infezioni da HIV ad AIDS del tutto manifesto (certi farmaci, sovraccarichi antigenici, ecc.), possano in effetti contribuire a ridurre la resistenza alle superinfezioni e ai tumori negli ospiti infetti da retrovirus;

3) valutare *in vivo* l'efficacia e la tossicità dei potenziali farmaci anti-retrovirus;

4) determinare l'utilità dei modificatori della risposta biologica, da soli o in combinazione con agenti antivirali, per combattere l'azione immunosoppressiva dei retrovirus. Fino ad oggi poco è stato fatto per sviluppare l'uso di tali sostanze per il trattamento delle infezioni virali. È opinione comune che terapie efficaci per l'AIDS richiedano trattamenti a lungo termine con agenti antivirali in combinazione con modulatori della risposta immunitaria. I modificatori della risposta biologica potrebbero essere utilizzati per diminuire la tossicità dei farmaci retrovirali, stimolando il sistema linfoemopoietico, oppure per potenziare la risposta immunitaria nei confronti delle infezioni virali.

# BIBLIOGRAFIA


BENDINELLI, M. AND NARDINI, L., 1973a. Immunodepression by Rowson-Parr virus in mice. 1. Growth curves of Rowson-Parr virus and immunological relationships with Friend virus. *Infect. Immun., 7:* 152-159.

BENDINELLI, M. AND NARDINI, L., 1973b. Immunodepression by Rowson-Parr virus in mice. 2. Effect of Rowson-Parr virus infection on the antibody response to sheep red cells *in vivo* and *in vitro. Infect. Immun., 7:* 160-166.

BENDINELLI, M., KAPLAN, G.S. AND FRIEDMAN, H., 1975. Reversal of leukemia virus induced immunosuppression *in vitro* by peritoneal macrophages. *J. Natl. Cancer Inst., 55*: 1425-1432.

BENDINELLI, M., MATTEUCCI, D. AND FRIEDMAN, H., 1985. Retrovirus-induced acquired immunodeficiencies. *Adv. Cancer 45*: 125-181.

BENDINELLI, M., MATTEUCCI, D. AND TONIOLO, A., 1986a. Retrovirus induced immunodeficiency in mice. In: A. Szentivanyi and H. Friedman (Editors), Viruses, Immunity and Immunodeficiency. Plenun Press, New York, NY, pp. 129-140.

BENDINELLI, M., MATTEUCCI, D., GIANGREGORIO, A.M. AND CONALDI, P.G., 1986b. Restoration of antibody responsiveness by endotoxin in retrovirus immunosuppressed mice: role of macrophages. In: A. Szentivanyi, H. Friedman and A. Nowotny (Editors), Biological Effects of Endotoxin. Plenum Press, New York, NY, pp. 465-478.

BLANCHARD, D.K., DJEU, J.Y., KLEIN, T.W., FRIEDMAN, H. AND STEWART, W.E., 1986. Interferon-induction by lipopolysaccharide: dependence on interleukin 2 and macrophages. *J. Immunol., 136*: 963-970.

Borzy, M.S., 1987. Interleukin 2 production and responsiveness in individuals with acquired immunodeficiency syndrome and generalized lymphadenopathy syndrome. *Cell. Immunol., 104*: 142-153.

BOWEN, D.L., LANE, H.C. AND FAUCI, A.S., 1986. Immunologic abnormalities in the acquired immunodeficiency syndrome. *Prog. Allergy, 37*: 207-213.

CEGLOWSKI, W.S. AND FRIEDMAN, H., 1969. Murine virus leukemogenesis. Relationship between susceptibility and immunodepression. *Nature, 224*: 1318-1319.

Cerny, J., Hensgen, P.A., Fistel, S.H. and Demler, L.M., 1976. Interactions of murine leukemia virus with isolated lymphocytes. II. Infection of B and T cells with Friend virus complex in diffusion chambers and *in vitro*: effect of polyclonal mitogens. *Int. J. Cancer, 18*: 189-196.

COPELAN, E.A., RIHEHART, J.J., LEWIS, M., MATHES, L., OLSEN, R. AND SAGONE, A., 1983. The mechanism of retrovirus suppression of human T cell proliferation *in vitro. J. Immunol., 131*: 2017-2020.

DESROSIERS, R.C. AND LETVIN, N.L., 1987. Animal models for acquired immunodeficiency syndrome. *Rev. Infect. Dis., 9*: 438-446.

FOWLER, A.K., TWADZIK, D.R., REED, C.D., WEISLOW, O.S. AND HELLMAN, A., 1977. Inhibition of lymphocyte transformation by disrupted murine oncoviruses. *Cancer Res., 37*: 4229-4531.

FRIEDMAN, H., BUTLER, R.C., SPECTER, S. AND NOWOTNY, A., 1988. Nontoxic endotoxin polysaccharide induces soluble mediators which potentiate antibody production by murine retrovirus-suppressed splenocytes. *J. Immunopharmacol., 10*: 282-293.

GUPTA, S., VAYUVEGULA, B., RUHLING, M. AND THORNTON, M., 1987. Interleukin 1 and interleukin 2 production in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. *J. Clin. Lab. Invest., 22*: 113-116.

HO, D.D., POMERANTZ, R.J. AND KAPLAN, J.C., 1987. Pathogenesis of infection with human immunodeficiency virus. *N. Engl. J. Med., 317*: 278-286.

JOHNSON, C.S. AND FURMANSKI, P., 1987. In vivo effects of tumor necrosis factor on normal and leukemic erythropoiesis. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res., 28*: 399.

JONES, K.S., RUSCETTI, S. AND LILLY, F., 1988. Loss of pathogenicity of spleen focus-forming virus after pseudotyping with Akv. *J. Virol., 62*: 511-518.

KLEINERMAN, E.S., LACHMAN, L.B., KNOWLES, R.D., SNYDERMAN, R. AND CIANCIOLO, G.J., 1987. A synthetic peptide homologous to the envelope protein of retroviruses inhibits monocyte-mediated killing by inactivating interleukin 1. *J. Immunol., 139*: 2329-2337.

KOO, G.C., CEGLOWSKI, W.S., AND FRIEDMAN, H., 1971. Immunosuppression by leukemia viruses. VI. Ultrastructure of individual antibody forming cells in the spleens of Friend leukemia virus-infected mice. *J. Immunol., 106*: 815-830.

LOPEZ-CEPERO, M., SPECTER, S., FRIEDMAN, H. AND BENDINELLI, M., 1988a. Altered IL-2 production during murine retrovirus infection. *Proc. 88th Annual Meet. Am. Soc. Microbiol.*, p. 109.

LOPEZ-CEPERO, M., SPECTER, S., MATTEUCCI, D., FRIEDMAN, H. AND BENDINELLI, M., 1988b. Altered interleukin production during Friend leukemia virus infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 188*: 353-363.

LOTZE, M.T., 1985. Treatment of immunologic disorders in AIDS. In: V.T. De Vita, S. Hellman and S.A. Rosenberg (Editors), AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention, J.B. Lippincot Company, Philadelphia, PA, pp. 235-246.

MATTEUCCI, D., GIANGREGORIO, A.M., LOPEZ-CEPERO, M., SPECTER, S., BENDINELLI, M. AND FRIEDMAN, H., 1989. Interleukins 1 and 2 production and responsiveness in the early stages of retrovirus infection of mice. *Cell. Immunol., 120*; 10-20.

MORRISON, R.P., NISHIO, J. AND CHESEBRO, B., 1986. Influence of the murine MHC (H-2) on Friend leukemia virus-induced immunosuppression. *J. Exp. Med., 163*: 301-314.

MORTENSEN, R.F., CEGLOWSKI, W.S. AND FRIEDMAN, H., 1973. Leukemia

virus induced immunosuppression. IX. Depression of delayed hypersensitivity and MIF production alter infection of mice with Friend leukemia virus. *J. Immunol., 111*: 1810-1819.

OLD, L.J., CLARKE, D.A., BENACERAFF, B. AND GOLDSMITH, M., 1959. The reticuloendothelial system and the neoplastic process. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 88*: 264-280.

OROSZ, C.G., ZINN, N.E., OLSEN, R.G. AND MATHES, L.E., 1985. Retrovirus mediated immunosuppression. I. FeLV and specific FeLV proteins alter T lymphocyte behaviour by inducing hyporesponsiveness to lymphokines. *J. Immunol., 134*: 3396-3403.

PAHWA, S., PAHWA, R., SAXINGER, C., GALLO, R.C. AND GOOD, R.A., 1985. Influence of human T lymphotropic virus/lymphadenopathy virus on functions of human lymphocytes. Evidence for the immune suppressive effects and polyclonal B-cell activation by handed viral preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82*: 8198-8205.

PETERSON, R.D.A., HENDRICKSON, R. AND GOOD, R.A., 1963. Reduced antibody forming capacity during the incubation period of Passage A leukemia in C3H Mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 114*: 517-520.

SPECTER, S. AND FRIEDMAN, H., 1978. Viruses and the immune response. *Pharmacol. Ther., A 2*: 595-622.

SPECTER, S., BENDINELLI, M., CEGLOWSKI, W.S. AND FRIEDMAN, H., 1978. Macrophage-induced reversal of immunosuppression by leukemia viruses. *Fed. Proc., 37*: 97-101.

SPICKETT, G.P. AND DALGLEISH, A.G., 1988. Cellular immunology of HIV infection. *Clin. Exp. Immunol., 71*: 1-7.

TONIOLO, A., MATTEUCCI, D., PISTILLO, M.P., GORI, Z. AND BENDINELLI, M., 1980. Early replication of Friend leukemia viruses in spleen macrophages. *J. Gen. Virol., 49*: 203-208.

WEISS, R., TEICH, N., VARMUS, H. AND COFFIN, I. (Editors), 1985. RNA tumor viruses: molecular biology of tumor viruses, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1233 pp.

WHEELOCK, E.F., TOY, S.T., WEISLOW, O.S. AND LEVY, M.H., 1974. Restored immune and non-immune functions in Friend leukemic virus mice treated with statolon. *Prog. Exp. Tumor Res., 19*: 369-390.

R. BOLDORINI, S. CRISTINA, L. VAGO, G. COSTANZI

# ASPETTI DELLA PATOLOGIA COMPARATA DA *LENTIVIRINAE*

## Indicazioni sulla patogenesi delle lesioni anatomiche in corso di infezione da HIV

## INTRODUZIONE

Nel 1983, all'inizio dell'epidemia di AIDS a Milano, le domande alla quali, come patologi, dovevamo più frequentemente rispondere riguardavano soprattutto il tipo di agenti opportunisti responsabili dei sintomi o della morte dei pazienti, o l'eventuale insorgenza di una neoplasia.

Ma ci apparve subito chiaro che dietro alla spesso drammatica patologia causata da più o meno noti agenti opportunisti, o a patogeni ingovernabili, esistevano altre peculiari lesioni, non ad essi attribuibili; e che esistesse, e dovesse quindi essere conosciuto, un substrato patologico attribuibile all'azione diretta del virus. Se infatti il virus era causa dell'immunodeficienza, e su questo almeno non poteva esservi dubbio, l'azione virale doveva svolgersi, e lasciare forse una traccia anatomicamente evidente a carico del sistema linfatico; ma quale traccia seguire per altre azioni del virus la cui impronta ci sembrava sospettabile anche in altri organi e in diversi tessuti?

Nella nostra esperienza qualche aiuto ci è giunto dalla tassonomia.

Come è noto il virus responsabile dell'AIDS è un membro del genere delle *Lentivirinae* che appartiene alla famiglia delle *Retroviridae*.

Questo genere comprende molti virus non oncogeni, — fra i quali quelli del visna-maedi, dell'artrite-encefalite della capra, dell'anemia infettiva del cavallo, il FIV, il virus dell'immunodeficienza della scimmia e l'HIV 2 — tutti associati ad una, più o meno marcata, alterazione del sistema immunitario; tutti infettanti cellule del "sistema dei fagociti mononucleati", inducendo la formazione di simplasmi, e tutti danneggianti una varietà di tessuti ed organi, ma principalmente il sistema nervoso centrale.

Ma, fino ad allora, non si avevano in patologia umana notizie di lesione da questi virus; lesioni conosciute invece dai patalogi veterinari, che da lungo tempo si erano occupati delle loro caratteristiche morfologiche (36, 45).

Così una prima traccia sulla patologia attribuibile ad una "lentivirina" ci è venuta dalla letteratura che riguardava le infezioni animali, almeno come primo parametro per individuare se il fenomeno osservato nell'uomo potesse entrare nello spettro di lesioni attribuibili ad un virus di quel genere.

Da allora il comune lavoro degli anatomo-patologi (10, 18, 35) ha dato alcuni risultati: molti problemi sono ancora irrisolti, ma siamo ora in grado di tracciare gli aspetti morfologici della patologia da HIV nel corso della storia naturale dell'infezione.

Da questa emerge immediatamente che l'azione patogena dell'HIV si esplica in modo diverso ed attraverso diversi meccanismi in vari tessuti; per quanto essi si sovrappongano a volte temporalmente in un non facilmente districabile intreccio di cause e perversi effetti, per dovere di chiarezza considereremo la patologia dei diversi organi separatamente, come segue.

## PATOLOGIA LINFOGHIANDOLARE

Quando un soggetto sieropositivo giunge all'unità medica riferisce solitamente sintomi sistemici, ma in genere, associati ad ingrossamento linfoghiandolare generalizzato, che è noto come "Sindrome Linfoadenopatica" (LAS) o "Linfoadenopatia Persistente Generalizzata (PGL)". (32, 33).

Durante il decorso della malattia i linfonodi vanno incontro a modificazioni successive (3, 4, 5, 14, 42), istologicamente rilevabili e riconducibili ad un modello ormai ben definito.

Se ne riconoscono comunemente quattro stadi (4).

1) Durante i primi mesi di LAS, i linfonodi si caratterizzano per alterazioni tipiche di una *linfoadenite follicolare iperplastica* (figura 1). Non esistono connotazioni specifiche inzialmente, ma una peculiare distribuzione di linfociti è spesso osservabile; essi pene-

trano nel centro germinativo follicolare (GC) fuoriuscendo dai capillari o passando attraverso la corona.

La quota di linfociti aumenta successivamente e appare essere dovuta principalmente al sottotipo CD8.

Tali aspetti sono sempre presenti e solitamente visibili nei preparati di *routine*, e caratterizzano lo "stadio uno" o "stadio dell'iperplasia dei centri germinativi".

2) Il secondo stadio è definto "stadio della lisi" o della "distribuzione dei centri germinativi": esso è caratterizzato dal danno dei centri germinativi, con la conseguente formazione di spazi lacunari (figura 2A). Se si colorano specificamente le cellule reticolari dendritiche (DRC), tali "lacune" appaiono essere provocate dalla loro progressiva scomparsa (23, 40, 41, 42, 49).

La lesione si associa all'ingresso dei linfociti CD8+ nei centri germinativi, che si vanno a porre in stretto contatto con le cellule dendritiche centro follicolari, tanto stretto da configurare spesso immagini di peri- ed emperipolesi linfocitaria nei confronti di queste.

Poiché è noto che questi fenomeni rappresentano l'equivalente ultrastrutturale dell'attacco linfocitario contro una cellula, resta da stabilire la natura dell'antigene sensibilizzante; ma già sono noti alcuni lavori che hanno evidenziato il ruolo dei linfociti citotossici CD8+ sensibilizzati dall'HIV; poiché le DRC contengono gli antigeni del *core* dell'HIV nel loro citoplasma in tutti i nostri casi (40, 41, 42), non sembra irragionevole credere che un meccanismo immuno-mediato contro il virus HIV contenuto ed espresso dalle cellule che presentano antigene nel centrofollicolo sia alla base della loro distruzione.

La lisi dei centri germinativi può essere anche osservata nei linfonodi di capre affette da "artrite-encefalite" (figura 2B), essendovi quindi un comune riscontro nelle infezioni di più retrovirus del genere delle lentivirine, si può pensare che tale danno possa essere dovuto ad una reazione del sistema immunitario contro peculiari antigeni.

Ma la patologia comparata ci suggerisce qualche spunto in più; il virus visna, che, al contrario il virus dell'artrite encefalite caprina, non comporta alcuna evidente compromissione dell'immuno-

competenza in patologia spontanea, non sembra causi alterazioni linfoghiandolari degne di nota.

Vi sarebbe anche da ricordare che la piuttosto frequente polinucleazione delle DRC potrebbe essere dovuta alla attività simplasmizzante dell'HIV (28). Virioni dell'HIV sono stati descritti in stretto contatto con le DRC (25, 27, 48, 54, 55) e immagini di *budding* dalle DRC stesse sono stati viste anche da noi. Questo fenomeno di replicazione del virus nelle DRC peraltro è un fenomeno solo rarissimamente osservabile, ed infatti mentre nelle DRC la presenza di proteine antigeni dal *core* virale (P18 e 24) è un reperto assolutamente costante, la presenza di antigeni dall'*envelope* non è mai stata messa in evidenza. Il fenomeno potrebbe essere dovuto ad una parziale replicazione virale in queste cellule?

In un recente lavoro (52) si riporta comunque la presenza di HIV-DNA integrato in omogenati di linfonodi ottenuti da pazienti LAS.

3) Nello stadio successivo, gli "spazi lacunari" tendono ad obliterarsi. Solo piccoli aggregati di materiale ialino prendono il posto dei precedenti centri germinativi (figura 3A e B); molti linfociti B sono dispersi nel linfonodo, ma l'aspetto predominante è l'incremento del numero di macrofagi. Questo quadro, il terzo, è ancora caratterizzato dalla presenza di rare DRC, ed è indicativo di una rapida evoluzione verso l'AIDS: il termine "involuzione dei centri germinativi" definisce molto bene tale situazione. Talvolta, sono visibili aspetti dei residui centri germinativi a bersaglio, Castleman simili, ma essenzialmente correlabili a sintomi di "iperplasia gigantofollicolare multicentrica", sempre con antigeni HIV dentro DRC residue.

4) Il quarto stadio è chiamato "stadio di deplezione". È il normale aspetto presentato dai linfonodi nell'AIDS conclamato dove si è raggiunta la totale distruzione dei centri germinativi. Sono completamente assenti le DRC e le sezioni linfoghiandolari sono caratterizzate da vasi proliferanti, massiccio aumento di macrofagi, talora plurinucleati e una variabile quota di linfociti B e plasmacellule (figura 4A e B).

Naturalmente nessuno degli aspetti precedentemente descritti è morfologicamente specifico in sè; ciò significa che una diagnosi di

infezione da HIV non può essere formulata su una sezione linfoghiandolare colorata con tecniche di *routine*.

Ma, nell'infezione da HIV, quando un patologo riceve una biopsia linfoghiandolare questa diagnosi è già fatta. Ciò nonostante, in qualsiasi momento venga effettuata una biopsia, l'aspetto morfologico dei centri germinativi riveste una grande importanza prognostica, come dimostra una analisi statistica che abbiamo condotto (57).

Riassumendo, possiamo affermare che i dati morfologici dimostrano che la progressione dell'infezione da HIV verso gli stadi successivi dell'immunodepressione è sottolineata dalla progressiva perdita delle DRC, la quale caratterizza gli stadi istologici successivi dell'infezione.

Pertanto, dalla stadiazione dei linfonodi è possibile ottenere sicure informazioni circa l'evoluzione della malattia. Ciò non sembra verificarsi nella capra affetta da artrite-encefalite; nei casi da noi osservati si avevano infatti aspetti di "involuzione", "lisi" e "deplezione" nello stesso linfonodo; ciò non avviene mai nell'uomo infetto da HIV ove sono presenti aspetti di passaggio solo tra stadi immediatamente successivi.

Nella fase di deplezione un posto importante spetta al frequente rilievo di cellule giganti: la loro presenza (MGC) sembra essere una particolarità importante, poiché, all'autopsia, il loro reperto è comune in molti organi e in particolare nel Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Le cellule giganti "HIV associate" hanno un diametro variabile fra 20 e 50 $\mu$ con citoplasma pallido con addensamento subcentrale di nuclei molto piccoli, simili a quelli visti nelle cellule giganti multinucleate del morbillo; benché tali cellule potrebbero sembrare legate alla attività simplasmizzante dell'HIV, noi non abbiamo mai trovato antigeni virali in esse, se non in quelle che si osservano nel sistema nervoso centrale.

È però del tutto frequente trovare tali cellule nei polmoni, ed è utile esaminare questo problema.

## PATOLOGIA POLMONARE

I clinici sanno perfettamente che l'interessamento polmonare è uno dei problemi più frequenti nella terapia dei pazienti AIDS; que-

sto è principalmente dovuto allo sviluppo di infezioni opportuniste, anche se in un buon numero di casi la ricerca di tali agenti è negativa, anche *post-mortem*.

In questi casi noi possiamo vedere aspetti di fibrosi interstiziale diffusa (35, 46), talvolta con cospicui infiltrati linfocitari settali, spesso associati a un danno alveolare diffuso, con alveolite desquamativa.

Gli infiltrati linfocitari settali sono preminenti nella "polmonite interstiziale linfocitaria" (LIP) del bambino e in alcuni casi adulti; la stretta somiglianza della LIP e l'artrite-encefalite della capra conferma il ruolo che le lentivirine possono giocare nelle infezioni polmonari (figura 5A e B) (1).

Casi di maedi osservati invece, grazie alla cortesia dei Dr. Petursson e Georgsson, mostrano una flogosi linfocitaria assai più imponente che, in più, è sempre presente anche a sei anni dall'infezione sperimentale.

Nell'uomo adulto, invece, anche in assenza di opportunisti dimostrabili, la fibrosi interstiziale polmonare prevale e, in questi casi, i macrofagi polinucleati sono comuni, anche in cellule provenienti da lavaggi broncoalveolari (LAB).

Sfortunatamente, noi non abbiamo scoperto alcuna evidenza immunocitaria o ultrastrutturale di infezione da HIV in esse, anche utilizzando l'ibridizzazione del DNA.

Solo utilizzando la tecnica della PCR è stato possibile scoprire sequenze HIV negli omogenati da LAB. Ma nonostante i LAB esaminati siano formati virtualmente solo da macrofagi — suggerendo che macrofagi polmonari contengano il DNA dell'HIV integrato — noi non possiamo escludere che la PCR riveli il DNA virale integrato in altri contingenti cellulari presenti.

Pertanto, fino a quando non saremo in grado di dimostrare la presenza del DNA virale in sezioni o strisci con cellule riconoscibili, il problema resterà non risolto; una patologia da HIV del polmone è dunque altamente probabile, anche se non incontrovertibilmente dimostrata.

## SISTEMA NERVOSO CENTRALE (SNC)

Il SNC rappresenta il principale organo bersaglio finale di molti dei virus appartenenti al genere delle lentivirine; di conseguenza una attenzione particolare è stata posta nello studiarlo, e varie lesioni, dove il coinvolgimento del sistema nervoso centrale è più di un sospetto, sono state descritte.

La prima di esse è rappresentata dalla presenza di aggregati micronodulari di cellule LeuM5 positive, simili a quelle viste nel visna (figura 6A e B) (15, 16, 34) o nella artrite-encefalite della capra (36); ma la relazione con l'HIV è dimostrata solo dalla presenza di antigeni virali nelle loro cellule, dato che noduli simili nell'uomo possono essere causati anche da qualche opportunista.

In molti casi questi noduli sono associati a cellule giganti (figura 7A e B) (come nel visna e nella leucosi bovina) assolutamente identiche a quelle osservate in altri organi in pazienti AIDS; ma nel sistema nervoso centrale le cellule giganti contengono antigene virali, sia del *core* che dell'*envelope*, di virioni retrovirali nel loro citoplasma, sia il loro *budding* dalla membrana cellulare — *o in vacuoli citoplasmatici* sono una caratteristica piuttosto comune mentre non è mai stata confermata *in vivo* la presenza di virioni HIV in cellule gliali e neurali (51).

Pertanto vi è un generale convincimento che solo le cellule giganti nel SNC rappresentino il marchio dell'infezione da HIV immediatamente riconoscibile anche in normali colorazioni istologiche (7, 8, 9, 19, 20, 24).

I *noduli* con cellule giganti sono presenti in circa il 20% dei casi; ma deve essere ricordato che la quantità di noduli scoperta è promozionale al numero di campioni e blocchetti esaminati. Deve essere anche ricordato che cellule giganti non in situazione nodulare, spesso isolate e disperse, sono presenti anche nelle forme che seguono (PDL e MV).

Un secondo aspetto, comune caratteristica dei pazienti HIV è la presenza di aree di demielinizzazione; e ciò ci ricorda immediatamente le lesioni da visna, recentemente riconosciute come legate a demielinizzazione primaria (15).

A prima vista il quadro di demielinizzazione nei soggetti infetti da HIV è piuttosto simile, benché non sia comune osservare lesioni così devastanti come quelle della pecora: le colorazioni per la mielina nell'uomo rivelano una discolorazione simmetrica diffusa nella sostanza bianca profonda — *mentre le aree subcorticali sono meglio conservate* — associata a una proliferazione diffusa di voluminosi astrociti reattivi; le cellule giganti sono sempre presenti, talora in aggregati nodulari, più frequentemente sparse nella sostanza bianca. Sono inoltre visibili rari infiltrati linfocitari perivascolari.

Questo aspetto è stato descritto (25) come "leucoencefalopatia progressiva diffusa" (PDL) ed è presente in circa il 30% dei casi nella nostra casistica.

Un altro quadro AIDS associato, che determina un danno delle fibre mieliniche, è la cosiddetta "mielinopatia vacuolare" (MV) (29, 44, 50); essa consiste in una degenerazione della mielina, assai simile a quella osservata nella carenza di vitamina B12.

Nei casi AIDS però non è mai stata osservata carenza di vitamina B12. Nella nostra esperienza ciò è stato osservato nel 15% dei casi e non appare così strettamente ristretto al midollo spinale come le lesioni dovute alla carenza di vitamina B12.

Morfologicamente questo quadro è associato ad una importante reazione astrogliale e con la presenza di macrofagi attivati; nell'encefalo il danno mielinico è meno importante e la reazione flogistica meno severa. Le fibre mieliniche sono diffusamente vacuolizzate con aspetto spongiforme che rappresenta un fenomeno sconcertante. L'aspetto spongiforme infatti è usualmente descritto nell'infezione del SNC da oncovirus (HTLV1-virus della leucemia murina, etc.), o nelle forme da "prioni", piuttosto che nelle infezioni da lentivirine. Nonostante questa difficoltà "teoretica", in recenti lavori (29) è stata riportata una coincidenza topografica di cellule giganti infette dall'HIV e di mielinopatia vacuolare, e anche noi abbiamo spesso riscontrato questo aspetto. Questa osservazione, comunque, che deporrebbe per una azione legata a HIV, non esclude una possibile coinfezione o una concomitanza di cause.

A proposito di forme «spongiformi» vorremmo però dire che se il termine si attaglia alla patologia da prioni (vedi *Creutzfeld-Jacob* o scrapie ovino), ove si osserva una imponente vacuolizzazione del

neuropilo con formazione di vacuoli e membrane, non dovrebbe essere utilizzato a proposito di mielinopatia ove il rigonfiamento e lo slaminamento degenerativo riguarda fondamentalmente la mielina, facilmente accompagnato da macrofagi fagocitanti e da infiltrati flogistici che mancano nelle forme da «prioni».

Sfortunatamente, nel SNC, nessuna delle lesioni che abbiamo descritto sopra come «associate all'HIV», è adeguata a spiegare i sintomi di demenza che sono l'aspetto più importante della cosiddetta "neuro AIDS".

Dobbiamo però ricordare che anche se si restringe il termine «lesioni HIV-specifiche» a quelle caratterizzate dalla presenza di macrofagi polinucleati, si hanno comunque con notevole frequenza, nelle autopsie di pazienti AIDS molti altri significativi reperti che sono, almeno fin'ora, correlabili alla presenza di macrofagi infettati dall'HIV solo per coincidenza topografica e casistica, ma senza che il microscopio possa scoprire alcuna relazione causale tra essi.

Ci riferiamo alla pressocché costante proliferazione di cellule microgliali nelle aree grigie, associata a quella degli astrociti, con immagini che non posssono essere morfologicamente distinte da quelle descritte nell'encefalopatia epatica, o in altre condizioni degenerative.

A questo proposito, sono emerse diverse ipotesi (30) riguardo al ruolo delle sostanze secrete dai macrofagi infettati (citochine), o di una competizione di antigeni virali nel metabolismo delle cellule nervose (6).

In netto contrasto con quanto avviene nel SNC, a carico del Sistema Nervoso Periferico (SNP) (43,48), almeno nella nostra esperienza, si osserva frequentemente una flogosi aspecifica interessante in particolare i gangli spinali ove gli elementi infiammatori si collocano intorno alle cellule gangliari con una disposizione che potrebbe suggerire un attacco immuno-mediato sulla componente neuronale del SNP (13).

## ALTRI ORGANI

Un danno diretto da HIV è stato ipotizzato in molti casi.

Per esempio, un infiltrato linfocitario nelle leptomeningi è stato

considerato, in alcuni casi, come il marchio dell'inizio dell'infezione da HIV nel sistema nervoso, il quale talvolta si presenta con sintomi acuti di meningite; è comunque molto raro scoprire casi di infezione da HIV che si presentino con tale sintomatologia.

Sono stati descritti infiltrati linfocitari cardiaci interstiziali (2,17) in alcuni casi di AIDS con aritmie; DNA dell'HIV integrato è stato osservato nell'epitelio tubolare di reni in casi di severa sindrome nefrosica (1). Una azione diretta dell'HIV è stata ipotizzata nel midollo osseo, nei genitali, nel fegato; certamente ora, quando il patologo si trova di fronte a lesioni che non può attribuire ad opportunisti, pensa all'HIV, ma solo raramente questa ipotesi può essere dimostrata.

Dobbiamo sottolineare che danni sicuramente provocati dall'HIV si osservano nei linfonodi e nel SNC; polmoni e midollo osseo sono probabilmente — *anche se non sicuramente* — danneggiati dall'HIV nella maggioranza dei casi; il coinvolgimento degli altri organi appare, nella nostra casistica solo incidentale.

Un riassunto della patologia da HIV può essere ora tentato, anche se molti aspetti restano oscuri.

L'inizio della attività patogena dell'HIV si manifesta precocemente nel tessuto linfoide dove esso causa la distruzione del sistema di presentazione degli antigeni nei centri germinativi dei linfonodi.

In termini morfologici possiamo dire che questo fenomeno è l'equivalente morfologico della progressiva immunoincompetenza.

La completa scomparsa dei centri germinativi è raggiunta in circa 4-8 anni a partire dalla data dell'infezione.

In un momento, durante questo periodo, vengono infettati gli elementi del sistema dei fagociti mononucleati; essi portano il virus ai vari organi, quali polmoni, reni, fegato, cute, genitali, midollo osseo, dove l'attività patogena dell'HIV può contingentemente aver luogo.

Presto o tardi, comunque, il sistema nervoso centrale diventerà l'organo bersaglio dell'HIV.

Noi non sappiamo quanto precocemente questo accada — *l'infezione talvolta si presenta con sintomi di demenza* — ma è più di un'ipotesi che l'attività dell'HIV si concreti con un danno diretto inferto al SNC, probabilmente con un meccanismo macrofago-

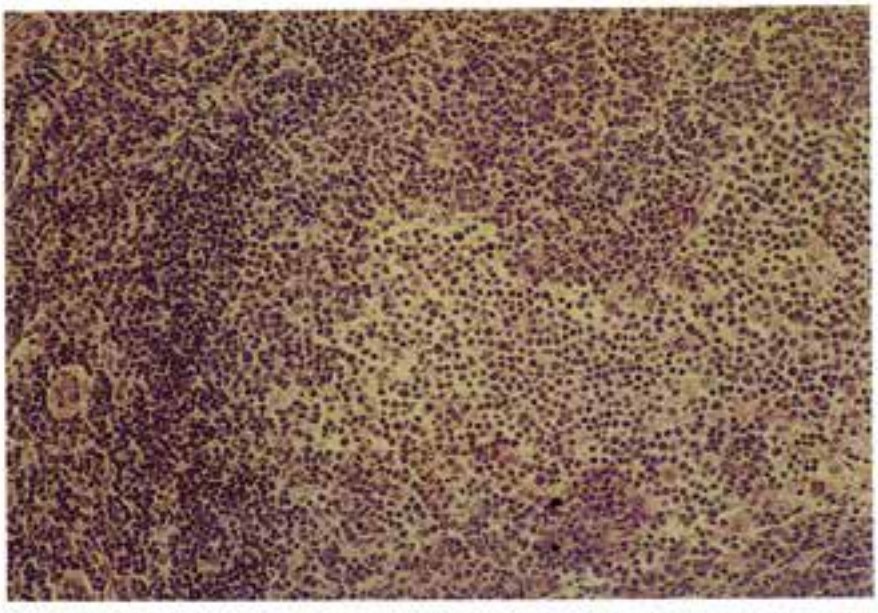
mediato, in un modo che è di per sé altamente debilitante per il paziente se non diretta causa di morte.

Su questo sfondo la grave immunodeficienza che nel frattempo si instaura provoca successive infezioni opportuniste o rende impossibile il trattamento di infezioni da comuni patogeni; frequentemente insorgono neoplasie.

Sono queste situazioni patologiche normalmente che abbreviano la vita del paziente, cosicché noi non abbiamo ancora le idee chiare circa il risultato finale della patologia da HIV: uno sguardo però a ciò che accade negli animali infetti da altre lentivirine non è certo consolante, sotto questo aspetto.

Molti dei nostri risultati sono stati ottenuti grazie al finanziamento del ministero della Sanità-Istituto Superiore di Sanità. N. 4206-26. (2° Progetto Nazionale AIDS).

Fig. 1 - Linfonodo con iperplasia follicolare. Ematossilina-Eosina 10 × o.m.

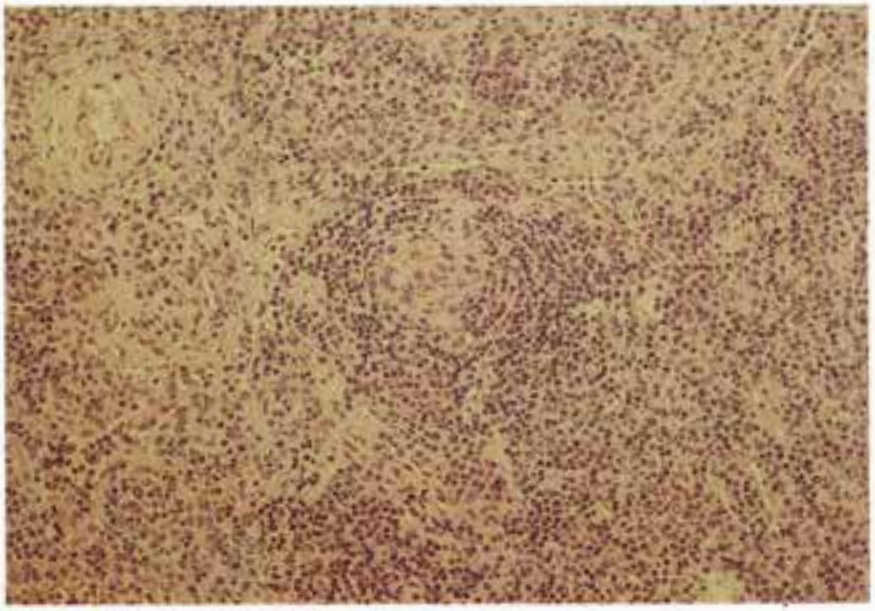


A

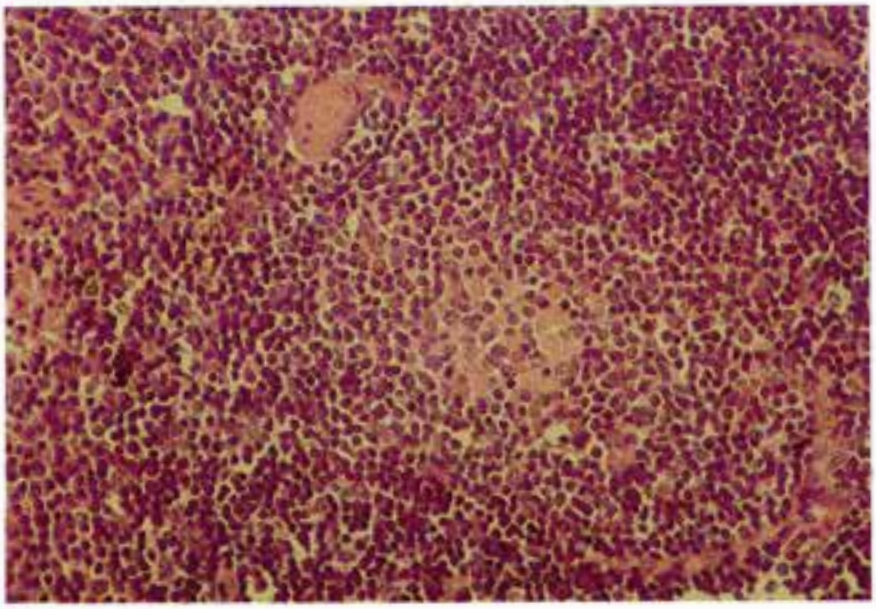
B

Fig. 2 A. Evidente lisi del centro germinativo in linfonodo umano. Ematossilina-Eosina 40 × o.m.

B. Stesso aspetto osservato in linfonodo di capra affetta da "artrite-encefalite". Ematossilina-Eosina 25 × o.m.



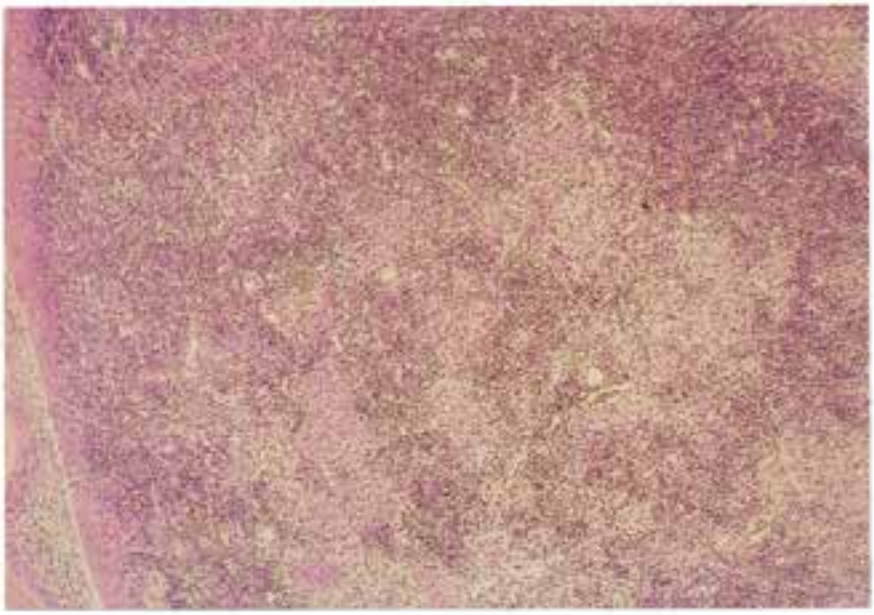
A



B

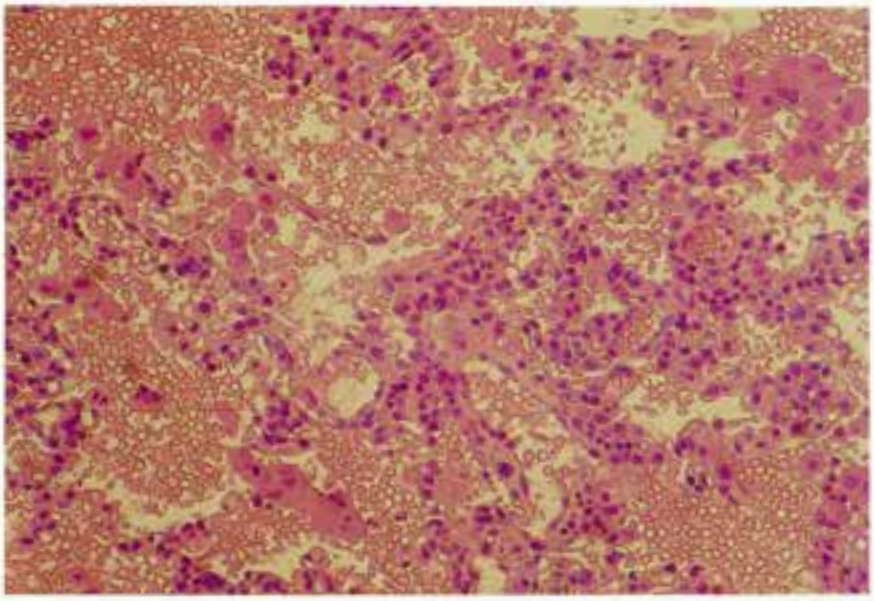
Fig. 3 A. Stadio della involuzione del centro germinativo che assume aspetto Castlemann simile. Ematossilina-Eosina 25 × o.m.
B. Stesso stadio in linfonodo di capra ove si osserva masserella jalina residua. Ematossilina-Eosina 40 × o.m.

A

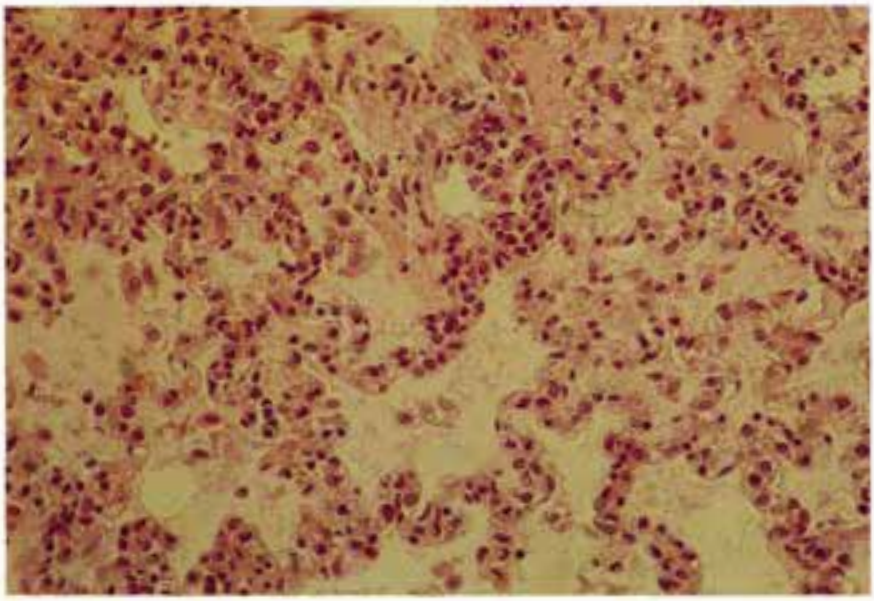


B

Fig. 4 A. Stadio della deplezione nell'uomo. Ematossilina-Eosina 25xo.m.
B. Stadio della deplezione nella capra. Ematossilina-Eosina 10 × o.m.

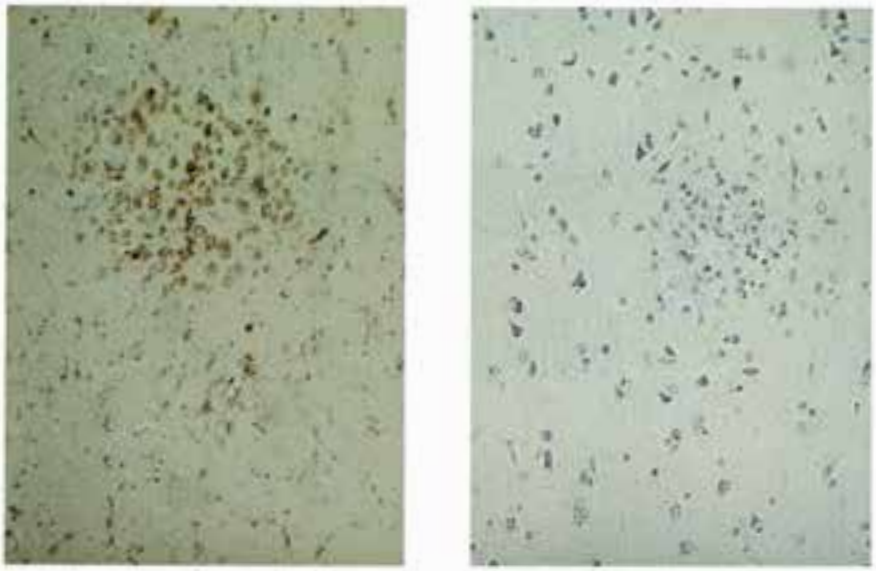


A

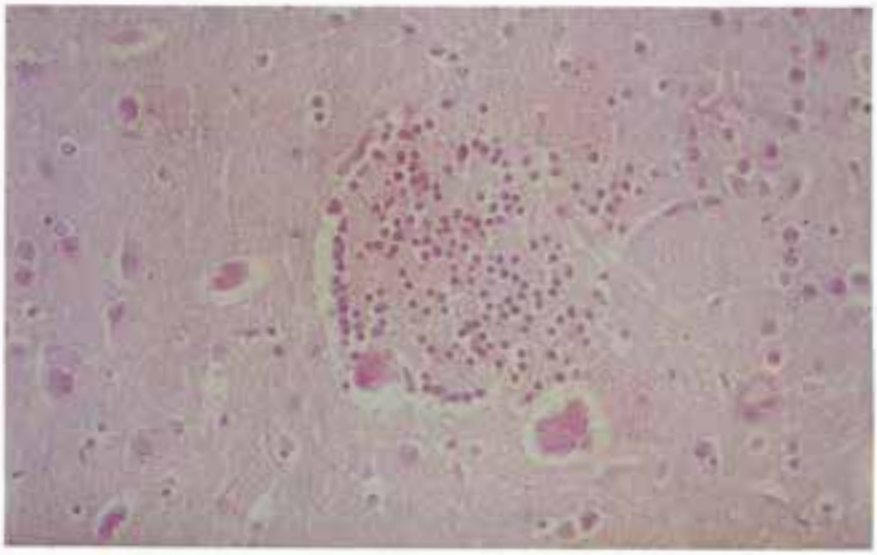


B

Fig. 5 A. Polmonite linfocitaria interstiziale nel bambino. Ematossilina-Eosina 40xo.m.
B. Polmonite linfocitaria nella capra. Ematossilina-Eosina 40 × o.m.



A



B

Fig. 6 A. Nodulo microgliale in encefalo umano; la colorazione immunoistochimica con LeuM5 ne dimostra il prevalente fenotipo monocito-macrofagico. Figura a destra Ematossilina-Eosina; figura a sinistra immunoperossidasi LeuM5 25 × o.m.

B. Nodulo microgliale in encefalo di pecora affetta da visna. Ematossilina-Eosina 25 × o.m.

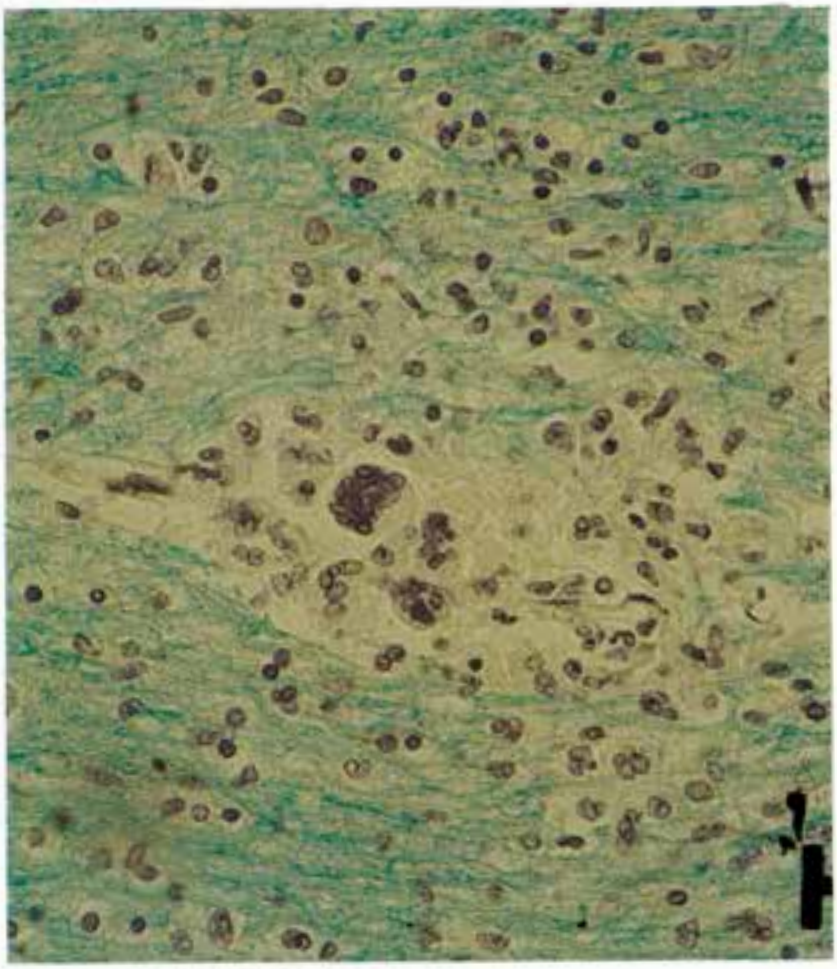


Fig. 7 A. Nodulo microgliale con evidenti cellule giganti multinucleate in AIDS. Luxol-Fast Blue 40 × o.m.

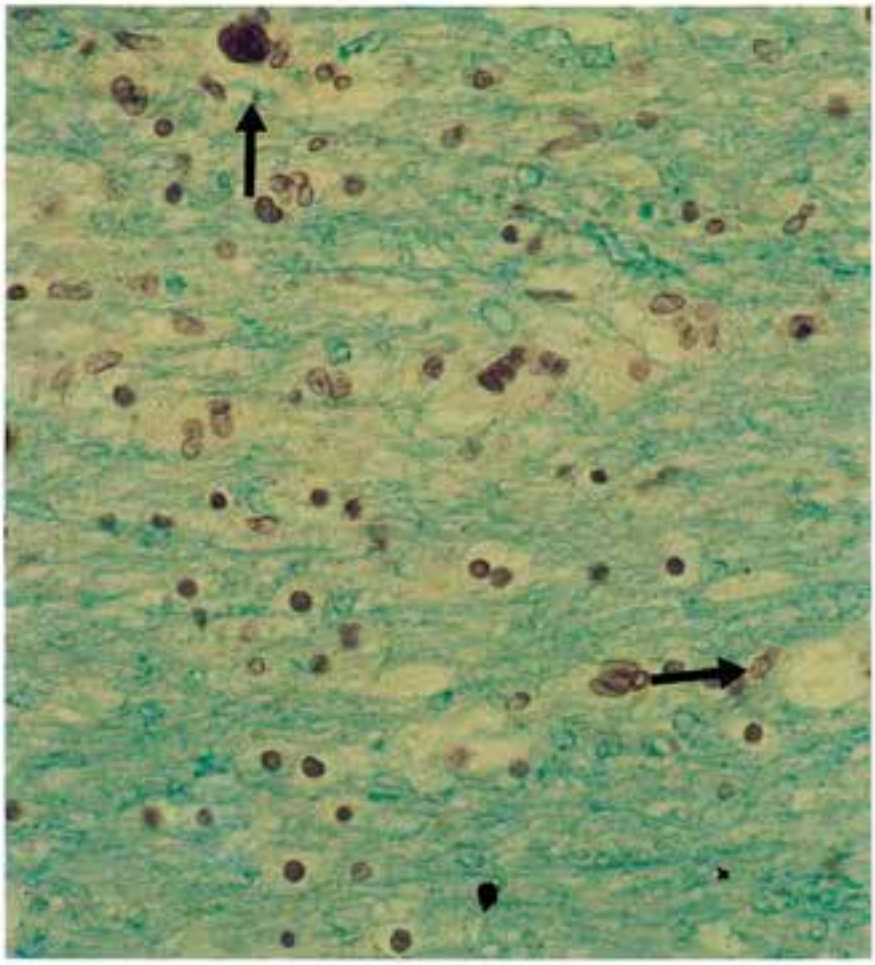


Fig. 7 B. Analoga lesione in encefalo con leucosi bovina che si osserva nelle cellule giganti multinucleate (frecce). Luxol-Fast Blue 40 × o.m.

18. Gullotta F., Kuchelmeister K., (1987) *Verh. Dtsch. Ges. Path. 71*, 505-ibid.

19. Gullotta F., Kuchelmeister K., Vollmer E., (1988). In: HIV and the Nervous System, Kubicky, Henkes, Bienzle and Pohle (Eds), pag. 49-52. Gustav Fisher V. Stuttgard-New York.

20. Haase A.T., (1986). In: Animal model of retrovirus infection and their relationship to AIDS , A. Salzman (Ed), Academic Press pag. 121-129.

21. Ioachim H.L., Lerner C.W., Tapper M.L., (1983) *Am. J. Surg. Pathol. 7*, 543-553.

22. Janossy G., Piching A.J., Bofill M., Weber J., Mc Laughlin J.E., Ornstein M., Ivory K., Harris J.R.W., Favrot M., MacDonald-Burns D.C., (1985) *Clin. Exp. Immunol., 59*, 257-266.

23. Kato T., Hirano A., Liena J.F., Dembitzer H.M., (1987) *Acta Neuropathol (Berl.) 73*, 278-294.

24. Kleihues P., Lang W., Burger P.C., Budka H., Vogt M., Maurer M., Luthy R., Siegenthaler W., (1985) *Acta Neuropathol. (Berl.) 68*, 333-339.

25. Koenig S., Gendelman H.E., Orenstaein J.M., dal Canto M.C., Pezeshkpur G.H., Yungbluth M., Janotta F., Aksamit A., Martin M.A., Fauci A.S., (1986) *Science 233*, 1089-1093.

26. Le Torneau A., Audouin J., Diebold J., Marche C., Tricottet V., Reynes M., (1986) *Hum. Pathol. 17*, 1047-1053.

27. Lifson J.D., Reyes G.R., Mc Grath M.S., Sttein B.S., Engleman E.B., (1986) *Science 232*, 1123-1127.

28. Maier H., Budka H., Lassmann H., Pohl P., (1989) *Acta Neuropathol. 78*, 497-503.

29. Merrill J.E., (1988) *Immunology Today 8*, 146-150.

30. Midvan V., Mathur U.U., Endlow R., (1982) *MMWR (31)*: 249-251.

31. Miller B., Stanfield S.K., Zach M.M., (1984) *JAMA* 251-246.

32. Modlin R.L., Meyer P.R., Amman A.J., (1983) *Lancet 2*, 768-771.

33. Narayan D., Kennedy-Stoskopf S., Zink M.C., (1987) *Annals of Neurology Suppl.to Vol 23*, pag. 595-600.

34. Nash G., Fliegel S., (1984) *Am. J., Clin. Pathol. 82*, 678-682.

35. Nathanson N., Panitch H., Palsson P.A., Petursson G., Georgsson G., (1976) *Lab. Invest. 35*, 444-460.

36. Navia B.A., Cho E.S., Petito C.K. Price R.M., (1986) *Ann. Neurol. 19*, 525-535.

37. Norman S., Smith M.C., (1983) *JAVMA, 182*, 1342-1345.

38. O' Murchada M.T., Wolf B.C., Naiman R.S., (1987) *Am. J. Surg. Pathol. 11*, 94-99.

39. Parravicini C.L., Lazzarin A., Galli M., Berti E., Erboni R., Costanzi G.C., (1984) *Am. J. Clin. Pathol. 82*, 749-750.

40. Parravicini C.L., Vago L., Costanzi G., Gluckman J.C., Klatzmann D., Nonnemacher L., Raphael, M., Berti E., Lazzarin A., Moroni M., Barrè-Sinoussi F., Chermann J.C., (1986) *Blood 68*, 595-596.

41. Parravicini C.L., Vago L., Costanzi G., Gluckman J.C., Klatzman D., Berti E., Barrè-Sinoussi F., Chermann J.C., Lazzarin A., Moroni M., (1985) *Boll. Ist. Sierot. Milan. 64*, 422-424.

42. Parry G.J., (1988) *Ann. Neurol. suppl. 23*, 49-53.

43. Petito C.K., Navia B.A., Cho E.S., Jordan B.D., George D.C., Price R.W., (1985) *New Engl. J. Med. 312*, 874-879.

44. Petursson G., Nathanson N., Georgson G., Panitch H., Palsson P.A., (1976) *Lab. Invest. 35*, 402-413.

45. Plata F., Autran B., Wain-Hobson S., Raphael M., Mayaud C., Denis M., Guillon J.M., Debrè P., (1988) *Nature 328*, 348-ib.

46. Price R.M., Brew B., Rosemblum M., Scheck A.C., Cleary P., (1988) *Science 239*, 586-592.

47. Przedborsky S., Lienard C., Voordecker P., Gerard J.M., Taelman H.H., Sprecher S., Goldman M., Hildebrand J., (1988) *Neurol. 235*, 359-361.

48. Racz P., Tenner Racz K., Kohl C., Feller A.C., Kern P., Dietrich M., (1986) *Progr. Allergy 37*, 81-181.

49. Schmidbauer M., Budka H., Okeda H., Cristina S., Costanzi G., Lechi A., Trabattoni G.R., (1989) *Clin. Neuropathol.* Abstr. 224.

50. Sharer L.R., Prineas J.M., (1988) *Infect. Dis. 1077*, 157-204.

51. Shibata D., Brynes R.K., Natwani B., Kwok S., Sninsky J., Arnheim N., (1989) *Am. J. of Pathol. 135*, 697-702.

52. Stanley M.W., Frizzera G. (1986) *Hum. Path. 17*, 1231-1239.

53. Tenner-Racz K., Racz P., Dietrich M., Kern P., (1985) *Lancet i*, 105-106.

54. Tenner-Racz K., Racz P., Bofill M., *et al.*, (1986) *Am. J. Pathol 123*, 9-15.

55. Turner R.R., Meyer P.R., Taylor C.R., Parkash S.G., Hofman F.M., Nichols P., Rasheed S., Levine A.M., (1987) *Am. J. Clin. Pathol. 88*, 10-19.

56. Vago L., Antonacci C.M., Cristina S., Parravicini C., Lazzarin A., Moroni M., Negri C., Uberti Foppa C., Musicco M., Costanzi G., (1989) *Appl. Pathol. 7*, 298-309.

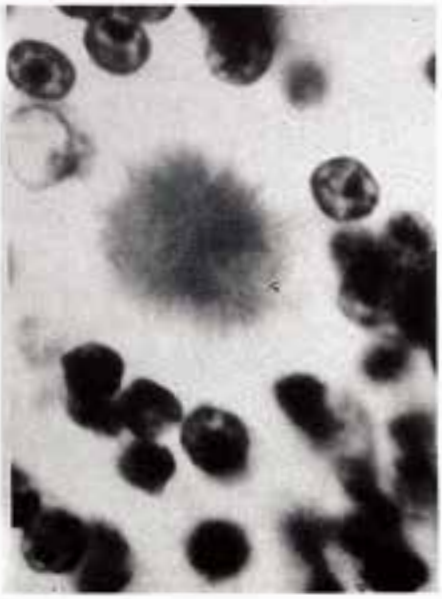
56. Vago L., Cristina S., Parravicini C., Costanzi G., Marchisio P., Principi N., (1989) *Path. Res. Pract. 185*, 165-ib. (Abstr).

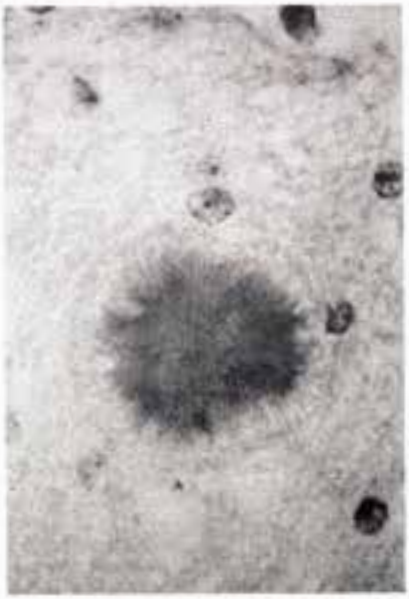
57. Vazeux R., Brousse N., Jarry A., Henin D., Marche C., Vedrenne C., Mikol J., Wolff M., Michon C., Rosenbaum W., Bureau J.F., Montagnier L., Brahic M., (1987) *Am. J. Pathol. 126*, 403-410.

58. Walker B.D., Chakrabart S., Moss B., Paradis T., Flynn T., Durno A.G., Blumberg M.S., Kaplan J.C., Hirsch M.S., Schoooley R.T., (1987) *Nature 328*, 345-ib.

# ENCEFALOPATIE SPONGIFORMI

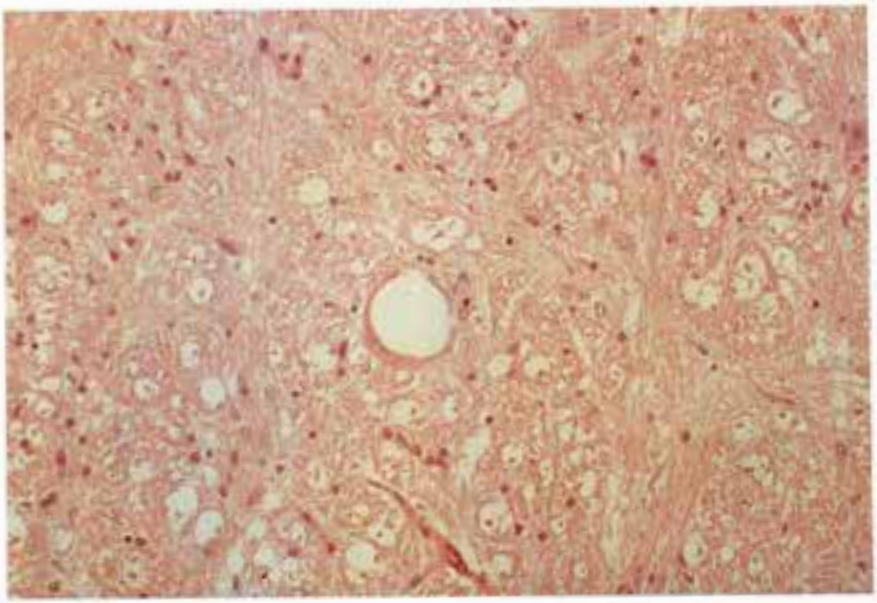
Donne e bambine del villaggio Paiti, nella Nuova Guinea, vittime del *Kuru* (anno 1957).
Il cannibalismo era responsabile della trasmissione dell'agente infettante.
(Da: Gajdusek C., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).





Caratteristiche placche amiloidi nel cervelletto di vittime del *Kuru*.
A sinistra: nello strato granulare.
A destra: nello strato molecolare.
(Da: Klatzo I. e Gajdusek C., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

Bovino colpito da "encefalopatia spongiosa" *(BSE)*.
È tipica l'espressione di "allerta" e la posizione del capo e delle orecchie.
(Da: Scott P.R., Università di Edimburgo, Scozia).



Sezione istologica di cervello con aspetto spongiforme.
Al centro: ampio vacuolo nel citoplasma di un neurone.
(Da: Sironi G., Bonizzi L. e Tapparelli P., Università di Milano e Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Sezione di Lugo, Ravenna).

H. FRASER

# LA *SCRAPIE* E I SUOI OMOLOGHI

AFRC & MRC Neuropathogenesis Unit - Edinburgo, Scozia

La comparsa di una malattia "*scrapie*-simile", nei bovini del Regno Unito, ha risvegliato interesse in un piccolo gruppo di malattie infettive cerebrali, alquanto peculiari, che colpiscono gli animali e l'uomo e il cui studio è da sempre stato riconosciuto come uno dei più difficili nella ricerca veterinaria e biomedica in generale.

Sebbene la *scrapie* della pecora sia una malattia comune e diffusa in quasi tutto il mondo, causando a volte ingenti perdite, è stata sino a poco tempo fa la "Cenerentola" della ricerca veterinaria; in effetti ha attirato attenzione solo da parte di coloro che, curiosi della sua natura insolita, erano preparati ad offrire la maggior parte della loro carriera al tentativo di darne una soluzione. Ancora oggi, infatti, può essere considerata l'enigma che è sempre stato, cioè mancanza di identità e totale ignoranza sull'effettivo agente causale e sulle basi molecolari della sua replicazione, nonché assenza di ogni reazione immunitaria e infiammatoria dell'ospite nei confronti della malattia e un periodo di incubazione straordinariamente lungo. Solo recentemente, le nuove acquisizioni nel campo della biochimica e della genetica sembrano fornire alcuni strumenti di studio per una possibile risposta agli insoluti quesiti.

## IL GRUPPO DELLE ENCEFALOPATIE DA "AGENTI LENTI NON CONVENZIONALI"

Queste malattie infettive degenerative del cervello si manifestano prevalentemente nei ruminanti; la loro peculiare vulnerabilità potrà pertanto fornire indicazioni per chiarire la relativa biologia

ed epidemiologia. Tra gli altri mammiferi, per ora solo i gatti, i visoni e gli uomini sono raramente colpiti da malattie di questo tipo; i visoni quasi certamente per il consumo di alimenti prodotti con carcasse di pecore infette da *scrapie,* mentre la fonte di contagio per l'uomo non è in genere nota e comunque non ci sono indicazioni circa l'intervento di possibili fonti animali, alimentari e non. D'altra parte, la comparsa di una malattia *scrapie*-simile nel gatto induce a considerare con attenzione e preoccupazione l'eventuale origine e parentela di questi agenti infettivi nelle diverse specie.

Sebbene vi siano differenze genetiche che condizionano la suscettibilità della pecora alla *scrapie,* è pur vero che tutte le razze di pecora possono venire infettate dall'agente della malattia se sono ad esso esposte. Comunque, a parte l'influenza genetica nella predisposizione alla *scrapie* della pecora e in alcuni casi eccezionali della malattia di *Creutzfeldt-Jacob* (CJ) dell'uomo, non paiono esservi influenze genetiche capaci di condizionare la suscettibilità a queste malattie nelle altre specie colpite.

Nella tabella 1 sono riportate le patologie "*scrapie*-simili" attualmente note. I criteri usati per impostare questa tabella sembrano suggerire che le malattie nelle differenti specie animali siano causate da agenti eziologici diversi. Al contrario, è invece verosimile che la malattia nella capra, gatto, visone, bovino e negli altri ruminanti compaia direttamente, o indirettamente tramite un ospite intermedio, a seguito di infezione operata dall'agente della *scrapie* della pecora; sembra invece che l'infezione nell'uomo si realizzi solo nell'ambito della stessa specie umana. Nonostante ciò è probabile che una specie animale possa sia propagare l'infezione nell'ambito dei suoi membri, sia acquisire l'infezione da un'altra specie; questa seconda possibilità è proprio quella che si realizza quando, a scopo diagnostico, si infettano gli animali da laboratorio con questa classe di agenti patogeni.

Una simile malattia pare anche avere colpito un gruppo di tigri bianche nello zoo di Bristol. Questo rilievo e la comparsa dell'encefalopatia trasmissibile del visone (TME) pongono alcuni risolvibili problemi sul rischio di contrarre la *scrapie* con l'alimentazione.

## MALATTIE *SCRAPIE*-SIMILI: EPIDEMIOLOGIA E INCIDENZA "IN CAMPO"

I focolai di *scrapie* possono causare, in alcune greggi infette, perdite sino al 20% negli animali adulti o anche di più. Probabilmente questi dati sottostimano la reale incidenza della *scrapie,* in quanto spesso la malattia non viene diagnosticata. Per di più, gli allevamenti di notevoli dimensioni considerano scontata una certa percentuale di perdite. La malattia sembra colpire tutte le razze ovine in quasi tutti i Paesi con la notevole eccezione della Nuova Zelanda e probabilmente dell'Australia. In Europa è stata segnalata quasi ovunque con la sola eccezione della Danimarca e probabilmente della Germania. Negli Stati Uniti, in particolare, ha avuto negli anni passati un impatto economico rilevante.

L'infezione passa agli agnelli a seguito di contaminazione placentale, inoltre, durante e subito dopo il parto il materiale contaminante rappresenta una notevole fonte di contagio per le altre pecore e agnelli. La contaminazione del pascolo nelle vicinaze immediate della zona del parto è pure una fonte di infezione. Come detto, inoltre, ci deve essere una certa predisposizione genetica nella pecora a contrarre la *scrapie*; pertanto l'agnello non solo deve ricevere l'infezione dalla madre o per contatto con materiale infettante, ma deve anche ereditare un appropriato genotipo dai suoi genitori. Il montone infetto non viene in genere considerato come possibile fonte di infezione per la sua progenie o quale fonte di infezione venerea per le femmine con le quali si accoppia; può comunque rappresentare fonte di infezione per contatto rispetto agli altri animali del gregge. Si hanno comunque scarse informazioni sulla trasmissione orizzontale della *scrapie* tra animali adulti; comunque tale evenienza è stata dimostrata sperimentalmente ed anche naturalmente tra pecora e capra; d'altra parte, rimane sempre l'impressione che non si tratti di una malattia altamente contagiosa: gli animali da laboratorio con infezione sperimentale non trasmettono l'infezione ai compagni di gabbia non infetti.

L'encefalopatia spongiforme del bovino (BSE) sembra avere avuto origine a seguito della alimentazione con prodotti contenenti farine di carne e ossa provenienti da carcasse di pecora *scrapie*-infette

e ciò ha causato la comparsa della BSE in Inghilterra con una altissima diffusione. Non si conosce ancora se la propagazione nel bovino possa avvenire per linee familiari ed è per questo che la comprensione del modo di diffusione di diversi tipi di malattie *scrapie*-simili in altri ruminanti, comprese pecore e capre, nonché la conoscenza del ruolo della placenta, possono essere molto importanti per lo studio epidemiologico della BSE.

Anche l'encefalopatia trasmissibile del visone (TME) è dovuta alla alimentazione con carcasse di ruminanti infetti, sia pecore, sia bovini. Anche se la TME può causare perdite catastrofiche, quando compare in un allevamento di visoni, è pur vero che si tratta di una malattia alquanto rara: in tutto il mondo ne sono stati descritti, a tutt'oggi, circa 50 focolai. Così come è stato visto nell'infezione sperimentale da *scrapie* nei roditori da laboratorio, anche la malattia del visone non viene trasmessa alla progenie e pure non si trasmette da animale ad animale per contagio diretto.

## LE FORME CLINICHE

La *scrapie* colpisce le pecore adulte di norma dopo i 2 anni di vita, con un picco di incidenza attorno ai 4-6 anni; comunque nuovi casi si manifestano continuamente in animali più vecchi, di ogni età. Anche nell'animale giovane può talvolta comparire, ma in genere non viene diagnosticata al di sotto dei 2 anni. La malattia si presenta come una forma tipicamente neurologica: inizialmente si osservano lievi sintomi, come modesti cambiamenti del comportamento, della postura e dell'interazione sociale con gli altri animali del gregge; tali segni divengono riconoscibili quando le pecore vengono tosate. A volte si osserva infatti uno iscurimento o un cambio di colore del vello, cui seguono dopo poco tempo, dei segni clinici più evidenti. Nel giro di alcune settimane si osserva una evidente progressione dei sintomi neurologici che possono essere di volta in volta diversi. L'animale malato può grattarsi contro strutture fisse lesionandosi la cute; sempre presenta alterazioni locomotorie con incoordinazione dei movimenti, tendenza ad inciampare, movimenti di oscillazione e nello stadio finale, costante posizione

di decubito. La durata dei segni clinici è in genere di numerose settimane.

Nella capra prevalgono i sintomi locomotori, mentre nella bovina colpita da BSE si osservano cambiamenti progressivi di comportamento e di locomozione e l'animale può divenire aggressivo; la forma clinica dura in genere molte settimane anche se alcuni casi non hanno superato la settimana. Nella CWD del cervo adulto il principale segno clinico è rappresentato dalla cachessia; inoltre, a seguito della degenerazione dei bulbi olfattori e del nucleo ipoglosso si osserva incapacità ad annusare e a prendere l'alimento. Tra i sintomi neurologici appaiono l'ipereccitabilità e i cambiamenti di comportamento, la difficoltà nella deglutizione del cibo e nel rigurgito del contenuto ruminale; inoltre si osservano polidipsia e poliuria e paralisi flaccida dei muscoli facciali e auricolari. Nel singolo caso di malattia osservato in un *nyala*, in cattività, e durato 3 settimane, si sono osservati una anormale postura della testa, tendenza a morsicarsi e leccarsi la groppa e aumentata frequenza urinaria. Nel visone, la malattia dura 3-8 settimane, con cambiamenti nel modo di alimentarsi e nella pulizia del mantello, posizione anormale della coda, movimenti rotatori, automutilazioni, alterazioni locomotorie e convulsioni, spesso terminanti in torpore e paralisi.

## PECULIARI PROPRIETÀ BIOLOGICHE DEGLI "AGENTI LENTI NON CONVENZIONALI"

L'identità molecolare degli agenti causali delle malattie *scrapie*-simili è ancora sconosciuta, nonostante il grande interesse che si è focalizzato su di loro. Una delle principali spiegazioni di questo insuccesso deriva dalla impossibilità di ottenere una effettiva purificazione del materiale infettante che sia separabile dalle componenti associate, derivate dai tessuti dell'ospite.

È comunque chiaramente accertato che vi sono molti ceppi dell'agente della *scrapie* e inoltre che alcuni ceppi possono subire delle mutazioni. Entrambi questi rilievi sono evidenza della verosimile presenza nell'agente infettante di una molecola informazionale,

tipo acido nucleico, che però a tutt'oggi non è ancora stato possibile riconoscere biochimicamente.

Non pare invece esservi chiara evidenza per un agente infettante costituito esclusivamente da proteine, come suggerito dall'ipotesi del "Prione" (proteina infettante), e questo nonostante la propaganda fatta per sostenere tale nozione. Un'attraente designazione per questo patogeno ancora sconosciuto è quella di "Virino", basata sull'idea, plausibile, dell'esistenza di una molecola informazionale (un acido nucleico) protetta da una proteina codificata dall'ospite. In effetti, quest'ultima ipotesi è consistente con l'estrema resistenza che gli agenti della *scrapie* e *scrapie*-simili dimostrano alla inattivazione chimica e fisica. Ad esempio, per inattivare gli agenti non convenzionali sono necessarie concentrazioni di alcali forti o soluzioni di ipoclorito anche 10 volte più alte rispetto a quelle necessarie per inattivare i batteri e i virus convenzionali; inoltre, alcuni ceppi di *scrapie* resistono anche ad un trattamento in autoclave a 126 °C e al trattamento in stufe con un calore secco pari a ben 360 °C. Verosimilmente, per decontaminare i pascoli, i ricoveri, le carcasse animali e i vari utensili e strumenti contaminati, sono necessarie condizioni ancora più drastiche.

L'ipotesi del "Virino" è anche consistente con la capacità dell'agente causale della *scrapie* di mostrare una variabilità biologica convenzionale: vi sono infatti numerosi ceppi dell'agente della *scrapie,* di cui almeno 20 sono distinguibili negli animali da laboratorio (topo e *hamster*). Bisogna però anche riconoscere le limitazioni del metodo di tipizzazione dei ceppi mediante l'inoculazione negli animali da laboratorio: la trasmissione della *scrapie* non è talvolta realizzabile e ciò suggerisce che il primo passaggio nell'animale da laboratorio rappresenti una forte pressione selettiva su determinati ceppi. La tipizzazione di ceppo nel topo richiede infatti una sequenza di sub-passaggi perché si osservi un'ulteriore selezione di sottoceppi. In effetti non vi sono assolutamente informazioni sulle basi biologiche o molecolari di queste variazioni di ceppo, dal momento che queste dipendono dalla trasmissione e dalla selezione in un *range* molto ridotto di ceppi di topi *inbred,* che sono stati scelti sulla base di espedienti piuttosto che a seguito di nozioni biochimiche e genetiche del singolo ceppo di topi. Per questi motivi, non

è dato di sapere in che grado un ceppo, selezionato quale mutante, rifletta le caratteristiche del ceppo originale del campo. Sebbene l'agente della BSE del bovino sia stato trasmesso al topo, il tempo di incubazione e i sintomi si sono dimostrati simili a quelli caratteristici di altri ceppi diversi; pertanto, a tutt'oggi, le informazioni ottenute dall'inoculazione nell'animale da laboratorio non forniscono alcun ausilio nell'identificazione dell'origine del ceppo che ha colpito i bovini. È comunque molto probabile, come già detto, che la BSE sia derivata dalla *scrapie* della pecora.

## LA BARRIERA TRA LE SPECIE

Le diverse specie animali vengono infettate meno facilmente quando vengono esposte a materiale infettante proveniente da un'altra specie che non dall'esposizione a materiale infettante proveniente dalla stessa specie. Ciò è stato dimostrato sperimentalmente inoculando omogenati di tessuti infetti; non è comunque chiaro se tale "effetto barriera di specie" possa fornire indicazioni significative utili per identificare o predire i rischi di trasmissione inter-specie, quando l'esposizione al materiale infettante avviene per vie naturali.

La barriera di specie può o non può funzionare a seconda della possibilità che nel nuovo ospite si possa replicare un ceppo del patogeno che rappresenti una componente minore del ceppo presente nell'ospite di origine; in tale caso la componente minore (ceppo mutato) è favorita nel nuovo ospite, rispetto al ceppo prevalente che subisce la pressione selettiva. In alternativa, la comparsa del ceppo mutato può realizzarsi dopo trasferimento del ceppo originale nel nuovo ospite. Qualunque sia il tipo di meccanismo che si esplica nel passaggio dell'infezione da un ospite ad un altro di specie diversa (entrambi i meccanismi paiono realizzabili) il rilievo di importanza pratica che può essere fatto è che, se vi è una forte selezione nell'ambito di una nuova specie, ciò può invalidare o confondere la tipizzazione dei ceppi, quando si usa la specie topo per tale finalità; può quindi essere difficile avere attendibili correlazioni epidemiologiche e causali quando i ceppi che si vogliono identificare derivano da altre specie animali. E' appunto per questi mo-

tivi che diviene di enorme importanza pratica conoscere l'identità molecolare di questi patogeni, al fine di mettere a punto tecniche di tipizzazione più attendibili, basate ad esempio sull'ibridizzazione molecolare di sonde ad acidi nucleici.

## CONTROLLO DELL'OSPITE SU INFEZIONE E PATOGENESI

Il successo dell'infezione dipende soprattutto dalla dose del materiale infettante e dalla via di penetrazione; una volta stabilitasi, l'infezione porta alla forma clinica solo se l'animale vive abbastanza a lungo. Non è per ora stato dimostrato che l'infezione non sia poi seguita dal coinvolgimento del sistema nervoso centrale; ciononostante tale evento non può essere escluso a priori. Come detto, il periodo d'incubazione dipende dalla dose e via d'infezione e nel topo e nella pecora è strettamente correlato all'allelismo rispettivamente dei loro geni *Sinc* (topo) e *Sip* (pecora). Con la sola eccezione dell'uomo, i geni omologhi delle altre specie non sono polimorfici (es. criceto e visone) o non si sono dimostrati tali (es., capra e bovino). Invece, i polimorfismi rilevati nel topo e nella pecora modificano sostanzialmente i tempi d'incubazione della malattia e come conseguenza si osserva che gli animali con genotipo cosiddetto "resistente" possono sopravvivere all'infezione da *scrapie*.

Comunque, vi sono alcuni ceppi di *scrapie* che non seguono questi criteri di suscettibilità o resistenza e pertanto eventi diversi dalle aspettative possono anche realizzarsi in campo.

Per quanto riguarda le conoscenze sulla patogenesi, queste derivano essenzialmente dagli studi condotti sui roditori in laboratorio. Il ruolo preminente è giocato dalla via di esposizione al materiale infettante: a seguito di inoculazione sottocutanea o intraperitoneale, si realizza una replicazione del patogeno nel sistema linfoide, mentre la penetrazione nel sistema nervoso centrale è un evento molto più tardivo ed è la conseguenza della diffusione alle fibre del sistema nervoso periferico (nervi autonomi) e quindi al midollo spinale. Parimenti l'esposizione per via orale o con l'alimento esita, con tutta probabilità, in una replicazione del patogeno nei tes-

suti linfoidi associati al tratto gastro-intestinale (GALT) quali ad esempio le tonsille e le placche del Peyer; comunque i dettagli patogenetici di tale via di infezione necessitano di ulteriori studi.

## DIAGNOSI, CONTROLLO ED ERADICAZIONE DELLE INFEZIONI *SCRAPIE*-SIMILI

La diagnosi basata sul riconoscimento dei segni clinici, da parte del veterinario o da parte di allevatori esperti, è in genere attendibile, soprattutto quando si conosce la storia del gregge o l'incidenza della malattia. La diagnosi clinica viene in genere confermata dalle indagini istopatologiche che evidenziano senza alcun dubbio la "vacuolizzazione" delle cellule nervose e loro processi.

Recentemente è stato prodotto un antisiero nel coniglio che reagisce con la proteina PrP (proteina del prione), che viene prodotta da geni *Sip, Sinc* o dai loro omologhi. Tale proteina, nell'animale infetto, diviene proteasi-resistente e precipita in forma insolubile nel cervello, causando le lesioni. Pertanto il rilievo di tale proteina alterata nelle sezioni o estratti cerebrali, mediante l'uso dell'antisiero specifico, potrà forse fornire un *test* diagnostico per il rilievo precoce dell'infezione in animali ancora clinicamente sani. Comunque tale approccio non ha per ora consentito rilievi definitivi e non può pertanto essere usato nella diagnostica di *routine*.

Il controllo della *scrapie* in campo si basa sull'identificazione genotipica della progenie e dei parenti delle pecore colpite. È auspicabile che i ceppi di pecore geneticamente resistenti possano venire identificati sulla base delle differenze molecolari che presentano nel loro gene *Sip*, impiegando la tecnologia delle endonucleasi (enzimi che tagliano selettivamente, in regioni specifiche, il DNA) in modo da identificare frammenti caratteristici di DNA associati alla resistenza. Questa possibilità è stata dimostrata nell'infezione sperimentale da *scrapie* nella pecora, ma è anche verosimile che gli animali "resistenti", pur non sviluppando i segni clinici, consentano la replicazione del patogeno e parimenti possano produrre una progenie "suscettibile" a ceppi diversi di *scrapie*.

## IMPLICAZIONI ZOONOSICHE E RISCHIO PER ALTRE SPECIE

Le numerose indagini epidemiologiche condotte non hanno identificato alcun rischio per l'uomo a seguito del contatto o consumo di pecore *scrapie*-infette; d'altra parte nuovi ceppi che compaiono in altre specie ospiti possono rappresentare un pericolo sconosciuto sia per l'uomo, sia per gli altri animali, ma, dato il lungo tempo di incubazione, tale rischio può non venire riconosciuto anche per molti anni.

Comunque, in termini pratici, nuove specie possono infettarsi solo quando vengono introdotte cariche infettanti sufficientemente elevate. Vi possono anche essere "barriere assolute" all'infezione tra specie diverse, soprattutto con ceppi di una determinata provenienza, quale ad esempio l'agente della encefalopatia del visone che non può essere trasmesso al topo da laboratorio; d'altra parte, la possibilità di una replicazione dell'agente infettante in assenza di coinvolgimento neurologico significa che, sulla base delle attuali insufficienti conoscenze, non si possono escludere fonti probabili di infezione, non identificabili, che diffondono la malattia da una specie all'altra.

**Tab. 1: Malattie *scrapie*-simili**

**Nei ruminanti**

- *Scrapie* della pecora
- *Scrapie* della capra
- Encefalopatia spongiforme del bovino (BSE)
- Malattie *scrapie*-simili nel:*
  - *nyala*
  - antilope
  - *kudu*
  - antilope araba
  - alce
- Sindrome del dimagramento cronico (CWD**) nel:
  - cervo
  - cervo dalla coda nera
  - alce delle Montagne Rocciose

**Nei non ruminanti**

- Malattia di *Creutzfeldt-Jakob* (CJ) dell'uomo***
- *Kuru* nell'uomo
- Encefalopatia trasmissibile del visone (TME)
- Malattia *scrapie*-simile nel gatto.

* Casi isolati in animali in cattività nei parchi e zoo
** CWD = *Chronic Wasting Disease*
*** E' inclusa una rara variante denominata "Sindrome di Gerstmann-Sträussler- Scheinker" (GSS)

## BIBLIOGRAFIA

ANON J. (1978). Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Department of Agriculture and Fisheries for Scotland. *ADAS Advisery Leaflet* 598.

HUNTER N., FOSTER J.D., DICKINSON A.G., HOPE J. (1989). Linkage of the gene for scrapie-associated fibrill protein (PrP) to the *Sip* gene in Cheviot sheep. *Veterinary Record, 124*, 364-366.

O. BUGIANI

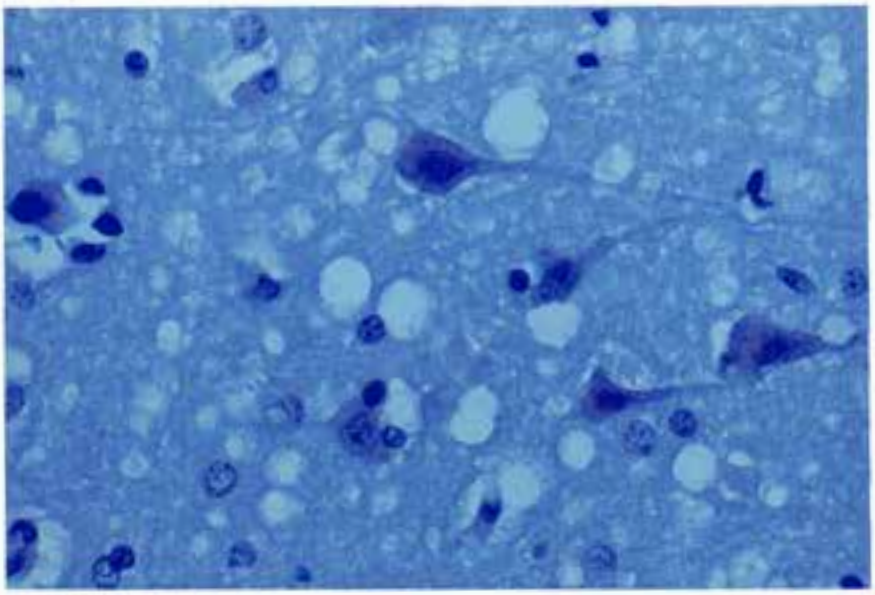
# NOSOGRAFIA DELLE ENCEFALOPATIE SPONGIOSE UMANE

Istituto Neurologico Carlo Besta, Milano

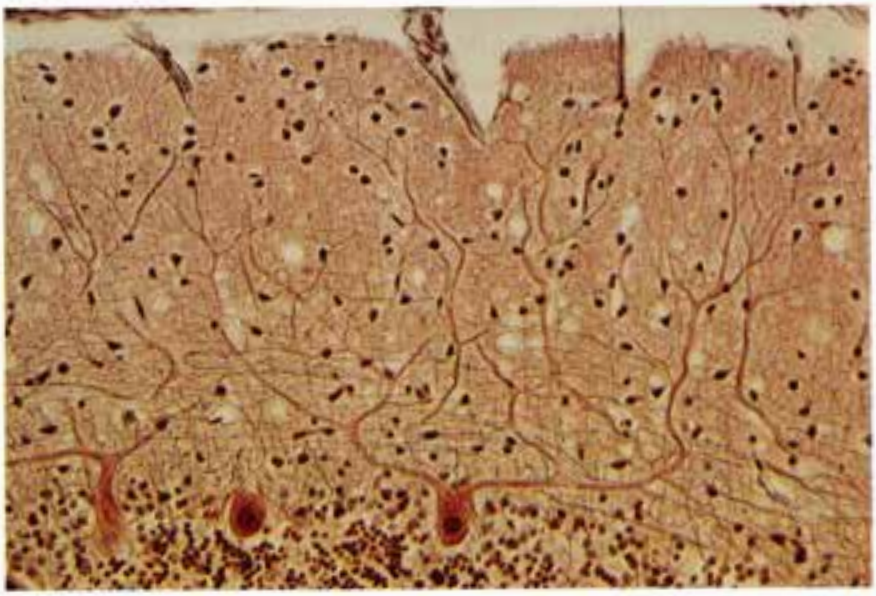
*Malattia di Creutzfeldt-Jakob*, *kuru* e malattia di *Gerstmann-Sträussler-Scheinker* (GSS) sono le encefalopatie spongiose dell'uomo. Esse hanno in comune fra loro e con le encefalopatie spongiose degli animali la trasmissibilità omo- ed eterospecifica, la degenerazione spongiosa dei neuroni e della glia, la proliferazione delle cellule gliali e la presenza di depositi di amiloide nel tessuto nervoso.

La *malattia di Creutzfeldt-Jakob* (CJ) è un'encefalopatia sporadica (ma sono descritti casi familiari) caratterizzata da demenza, compromissione dei meccanismi posturali, mioclonie e, sul tracciato elettroencefalografico, punte periodiche (1-2 c/s). CJ colpisce maschi e femmine soprattutto fra i 50 e i 70 anni d'età e ha esito fatale entro un anno, raramente oltre, dall'esordio dei sintomi. Lesioni paradigmatiche della CJ sono l'atrofia del cervello (fino al 50% del peso medio) conseguente alla rarefazione neuronale; la spongiosi della corteccia cerebrale (Figura 1), di alcuni nuclei sottocorticali (soprattutto del talamo) e talvolta della sostanza bianca (Figura 2), dovuta a rigonfiamento dei processi cellulari dei neuroni (Figura 3) e della glia; la gliosi cellulare provocata dalla proliferazione della glia astrocitaria (Figure 4 e 5); e, in qualche caso, i depositi di amiloide, piuttosto discreti e localizzati nella corteccia del cervelletto (Figura 6). La malattia è ubiquitaria nel mondo e da quando la si studia mantiene un'incidenza costante pari a un caso per milione di abitanti all'anno, salvo dove si manifesta (ma limitatamente a particolari etnie) come malattia endemica. CJ non ha prospettive di terapia.

*Kuru* era il tremore endemico dei Fore della Nuova Guinea. La malattia si trasmetteva dal malato al sano grazie a un rituale can-



A



B

Fig. 1 Malattia di *Creutzfeldt-Jakob*: vacuoli di spongiosi nel neuropilo. A) della corteccia cerebrale (Ematossilina-Eosina) e B) cerebellare (Bodian).

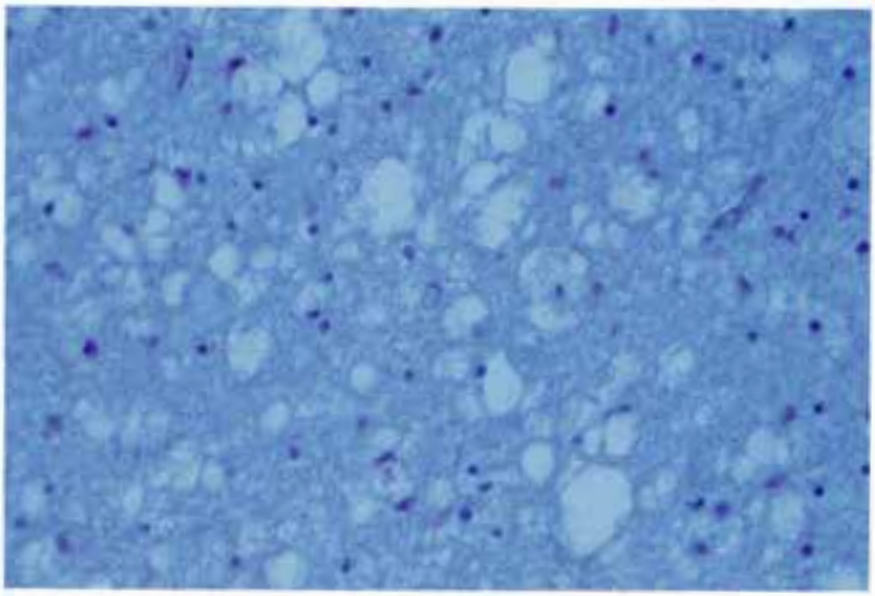


Fig. 2 Malattia di *Creutzfeldt-Jakob*. Spongiosi della sostanza bianca sottocorticale (Ematossilina-Eosina)

nibalico legato al culto dei defunti. Il *kuru* è quasi scomparso da quando il rituale è stato proibito.

La *malattia di Gerstmann-Sträussler-Scheinker* è una demenza con disturbi della postura, atassia in particolare. GSS è stata descritta in poche famiglie nel mondo e in qualche eccezionale caso sporadico. Lesione paradigmatica sono i depositi di amiloide nelle strutture grige dell'encefalo, specialmente numerosi nella corteccia del cervelletto.

La storia nosografica di queste malattie umane è legata a quella delle malattie che ne costituiscono l'equivalente negli animali e passa attraverso la formulazione di quattro concetti. Sono in ordine di tempo i concetti di infezione virale lenta, encefalopatia spongiosa subacuta, demenza trasmissibile e encefalopatia da prioni.

Il concetto di infezione virale lenta fu messo a fuoco sulla base di caratteristiche comuni a tre malattie della pecora, due neurolo-

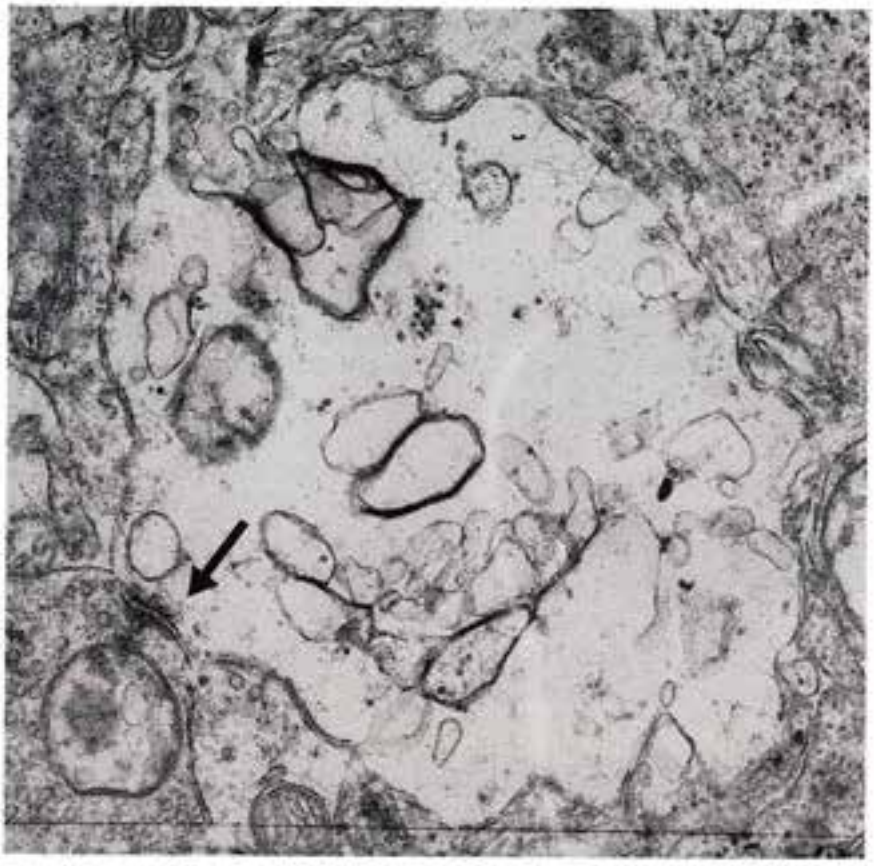
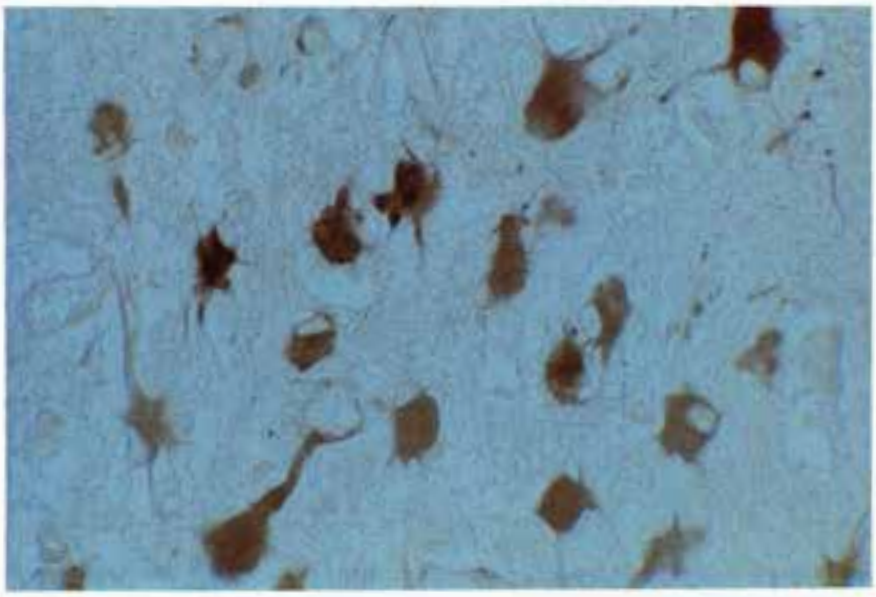


Fig. 3 Malattia di *Creutzfeldt-Jacob*. Al microscopio elettronico è evidente il rigonfiamento di un processo neuronale con proliferazione di membrane. Il processo neuronale è riconoscibile dalla presenza di una sinapsi (freccia).

giche (*scrapie* e *visna*) e una polmonare (*maedi*). Tali erano l'incubazione di lunga durata e asintomatica, l'evoluzione progressiva e sempre mortale di un'affezione circoscitta a un solo organo, e la trasmissibilità della malattia ad altri animali, anche di specie differente. L'attribuzione di *kuru* e CJ alle infezioni virali lente fu ipotizzata sulla base delle analogie fra queste malattie umane e la *scrapie* riguardo le lesioni cerebrali e il decorso. Di qui il concetto di ence-



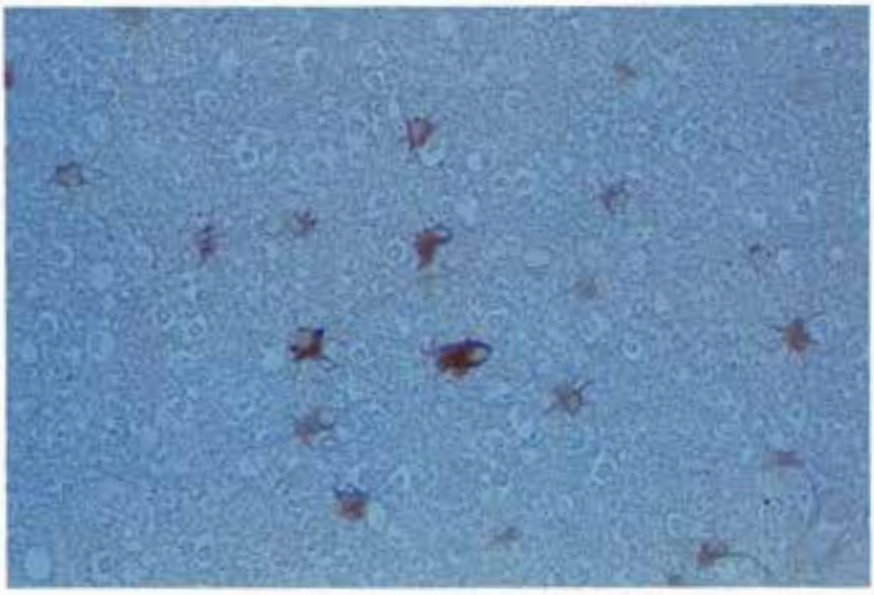


Fig. 4 Malattia di *Creutzfeldt-Jakob*. Proliferazione dell'astroglia nella corteccia cerebrale (Immunocolorazione con anticorpi contro la proteina acida gliofibrillare).

Fig. 5 Malattia di *Creutzfeldt-Jakob*. Proliferazione dell'astroglia nella sostanza bianca (Immunocolorazione con anticorpi contro la proteina acida gliofibrillare).

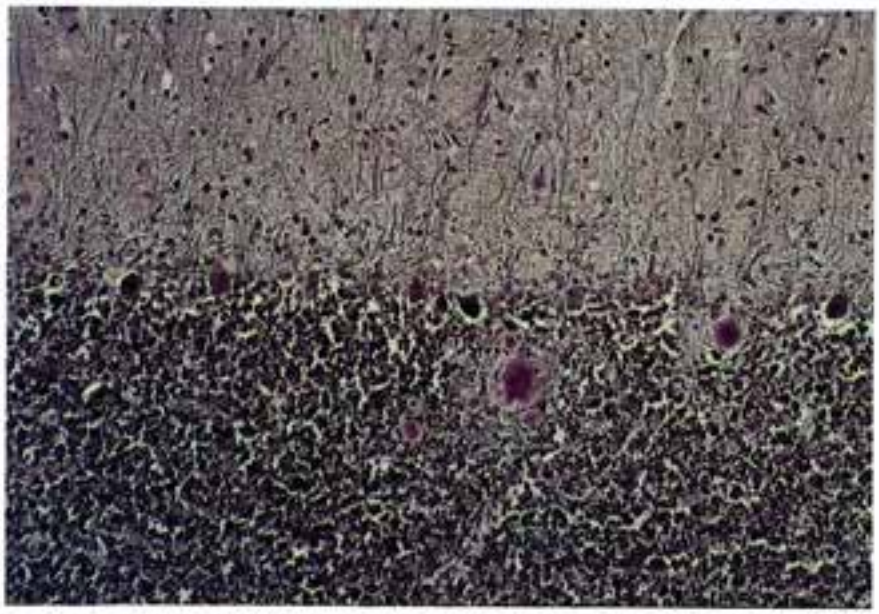


Fig. 6 Malattia di *Creutzfeldt-Jakob*. Depositi di amiloide nella corteccia cerebellare, in corrispondenza dello strato delle cellule di Purkinje (Acido periodico-Schiff).

falopatia spongiosa subacuta formulato per *kuru*, CJ, *scrapie* e anche per l'encefalopatia trasmissibile del visone onde far risaltare l'organo colpito (il cervello), la lesione (la spongiosi neuronale e gliale) e l'evoluzione (né acuta né cronica). Inoltre, l'assenza di segni tissutali e umorali di ingaggio del sistema immunitario, altro aspetto caratteristico di queste malattie, suggeriva che il/i virus coinvolti nell'eziologia erano diversi dai virus convenzionali almeno per come interagivano con l'ospite: per questo furono chiamati «virus non convenzionali».

Le encefalopatie spongiose subacute umane si sono rivelate trasmissibili ai primati e agli animali di laboratorio. Ciò ha giustificato il concetto di demenza trasmissibile con cui si intendeva isolare *kuru* e CJ in quanto malattie trasmissibili umane caratterizzate da demenza e si voleva speculare sulla possibilità che altre demenze

fossero causate da virus non convenzionali. Il concetto si è dimostrato valido oltre che per *kuru* e CJ anche per la maggior parte dei casi di GSS, ma non per altre demenze presenili di molto maggior peso epidemiologico come la malattia di *Alzheimer*.

La trasmissibilità ha promosso lo studio delle caratteristiche del virus non convenzionale che ha portato alla definizione del concetto di prione. Ultracentrifugando il tessuto cerebrale di visoni affetti da *scrapie* si sono separate numerose frazioni proteiche, di cui una 30 volte più infettante del tessuto di partenza. Delle proteine di questa frazione, una (resistente agli agenti che inattivano gli acidi nucleici e idrolizzata solo in parte dalla proteinasi K) risulta essere di dimensioni inferiori a quelle dei virus più piccoli e dei viroidi delle piante. Si ritiene che questa proteina faccia parte dell'agente non convenzionale responsabile della *scrapie* o coincida addirittura con esso. A questo agente si dà il nome di «prione», per sottolinearne la natura proteica e le differenze (dimensioni comprese) rispetto a virus e viroidi. La proteina del prione (PrP) è presente tanto nel tessuto cerebrale sano quanto in quello di animali ammalati di *scrapie* o di uomo con CJ. Essa ha peso molecolare di 33-35 kDa, consta di 253 (uomo) o 254 (visone) aminoacidi e deriva da un precursore di 29.8 kDa. La proteinasi K idrolizza completamente la PrP del tessuto cerebrale normale, mentre non riesce a idrolizzare oltre un frammento di 27-30 kDa la PrP isolata dal cervello di uomo o animale con encefalopatia spongiosa. Il frammento di 27-30 kDa tende a polimerizzare assumendo una struttura fibrillare con caratteristiche tintoriali (congofilia) e ottiche (birifrangenza dopo Congo rosso, fluorescenza dopo tioflavina S) dell'amiloide. Il frammento di 27-30 kDa dovrebbe essere particolarmente significativo per l'eziologia delle encefalopatie spongiose. Il gene che codifica per PrP si trova sul cromosoma 20 (uomo). Il messaggero per l'espressione di questo gene e concentrato nei neuroni. La durata del periodo d'incubazione della malattia è controllata da due geni situati sui cromosomi 2 e 17 (topo), ciò che fa supporre l'esistenza di due PrP, l'una responsabile delle forme di encefalopatia spongiosa che hanno un'incubazione più breve (alcuni animali di laboratorio) e l'altra per quelle a incubazione protratta (uomo).

La possibilità che i depositi di amiloide siano costituiti da am-

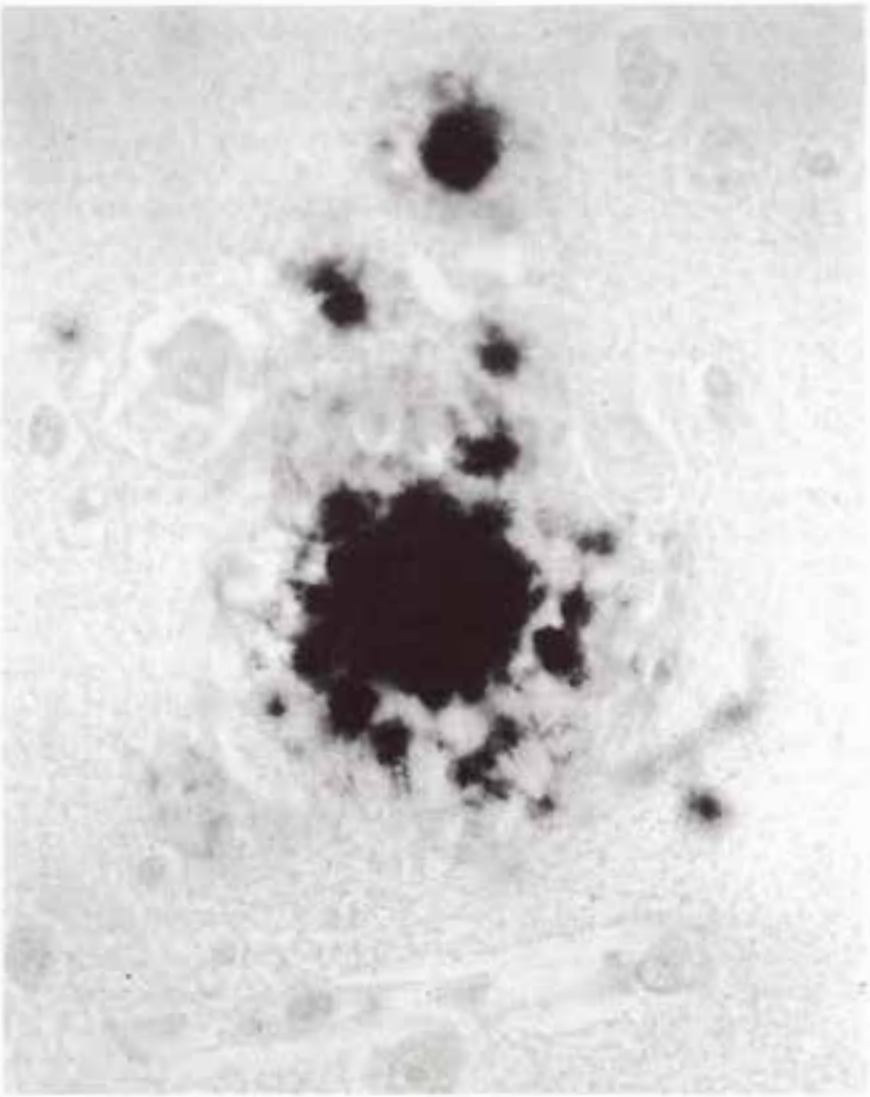


Fig. 7 Malattia di *Gerstmann-Sträussler-Scheinker*. Depositi di amiloide nella corteccia cerebrale. (Immunocolorazione con anticorpi anti-PrP).

massi di prioni consente di riunire fra le encefalopatie da prioni tutte le malattie umane e animali caratterizzate da depositi cerebrali di amiloide riconosciuti da anticorpi diretti contro PrP (Figura 7). Secondo questo criterio, oltre CJ (uomo), *kuru* (uomo), GSS (uomo), *scrapie* (pecora, capra) e encefalopatia trasmissibile (visone), appartengono al gruppo delle encefalopatie da prioni anche la cachessia cronica del cervo e dell'alce in cattività e l'encefalopatia spongiosa subacuta dei bovini d'allevamento.

L'origine delle encefalopatie da prioni si fa ipoteticamente risalire alla *scrapie*. L'ingestione di carcasse di pecore morte di *scrapie* sarebbe la causa dell'encefalopatia trasmissibile del visone, mentre la contaminazione dei pascoli avrebbe dato origine alla cachessia cronica del cervo e dell'alce in cattività e quella dei mangimi industriali all'encefalopatia spongiosa dei bovini d'allevamento. La via alimentare è ipotizzata per derivare CJ dalla *scrapie* e il *kuru* da CJ. D'altra parte, essa è certa per la trasmissione interumana del *kuru*. Il rapporto fra CJ sporadica, CJ familiare e GSS è oscuro, così come lo sono i meccanismi che regolano l'incidenza e la trasmissione della *scrapie* fra pecore e capre e di CJ fra gli uomini. Si conoscono casi di trasmissione interumana di CJ da contaminazione del cervello sano con tessuti (cornea, meninge) di individui deceduti di encefalopatia spongiosa o con ferri neurochirurgici infetti (l'ipoclorito di sodio sterilizza il materiale contaminato), e casi dovuti alla somministrazione parenterale di tessuti (estratti di ipofisi) ammalati.

## BIBLIOGRAFIA


GAJDUSEK D.C.: Unconventional viruses causing subacute spongiform encephalopathies. In B.N. Field (ed), Virology, Raven Press, New York 1985, pp 1519-1557.

GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR.: Brain Amyloidoses. Precursor proteins and the amyloids of trasmissible and nontrasmissible dementias: scrapie-kuru-CJ viruses as infectious polypeptides or amyloid-enhancing factors. In A.L. Goldstein (ed), Biomedical Advances in Aging, Plenum, NewYork 1990, pp 3-24.

GIBBS C.J. JR., GAJDUSEK D.C.: Transmission and characterization of the agents of spongiform virus encephalopathies: Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, scrapie and mink encephalopathy, Res Publ ARNMD (vol. 44): Immunological disorders of the Nervous System, William & Wilkins, Baltimore 1971, pp. 383-410.

MERZ P.A., SOMMERVILLE R.A., WISNIEWSKI H.M., MANUELIDIS L., MANUELIDIS E.E.: Scrapie associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease, *Nature 306*: 474-476, 1983.

MICHEL B.: Les encéphalopathies dues aux prions. *Rev. Neurol. (Paris) 146*: 1-11, 1990.

PRUSINER S.B.: Novel proteinaceous infectious particles causes crapie, *Science 216*: 136-144, 1982.

SIGURDSSON B.: Observations on three slow infections of sheep. *Brit. Vet. J. 110*: 255-270, 1954; *110*: 307-322, 1954; *110*: 341-354, 1954.

TRAUB R., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.U. JR.: Transmissible virus dementia: the relation of transmissible spongiform encephalopathy to Creutzfeldt-Jakob Disease. In M.L. Smith, M. Kinsbourne (eds) Aging and Dementia, Spectrum Publications, New York 1977, pp 91-172.

D. CARLETON GAJDUSEK[1]

# GLI AGENTI DI *SCRAPIE* - *KURU* - CJD - BSE, QUALI POLIPEPTIDI INFETTANTI: IPOTESI DELLA LORO SINTESI *"DE NOVO"* DA UN NORMALE PRECURSORE PROTEICO DELL'OSPITE[2]

Laboratory of Central Nervous System Studies,
National Institute of Health, Bethesda, Maryland, (U.S.A.)

Il *kuru* e le demenze trasmissibili sono raggruppate tra quelle infezioni lente da agenti non convenzionali, denominate *"encefalopatie spongiformi sub-acute"* a motivo delle caratteristiche e sorprendentemente simili lesioni istopatologiche che inducono. Parimenti la *scrapie* della pecora, le malattie *scrapie*-simili degli altri ruminanti, l'encefalopatia trasmissibile del visone (TME) e l'encefalopatia spongiforme del bovino (BSE) dimostrano di appartenere allo stesso gruppo sia per i comuni aspetti istopatologici e patogenetici, sia per le similitudini tra gli agenti infettivi causali. Le tipiche lesioni neurocitologiche di tutte queste malattie sono rappresentate da: una progressiva vacuolizzazione dei processi dendritici e assonali e dei corpi cellulari dei neuroni e, in grado minore, degli astrociti e oligodendrociti; una ipertrofia e proliferazione astrogliale diffusa e una alterazione spongiforme della materia grigia, con estesa degenerazione neuronale.

Queste infezioni atipiche differiscono dalle altre patologie cerebrali dell'uomo, dimostratesi poi sostenute da virus convenzionali lenti, in quanto esse non evocano alcuna reazione infiammatoria virus-associata nei tessuti cerebrali colpiti (ad es., non vi sono manicotti perivascolari o invasione del parenchima cerebrale da parte dei leucociti); inoltre non vi è segno di pleiocitosi o di un marcato incremento di proteine nel fluido cerebrospinale (FCS), durante tutto il corso dell'infezione. Per di più non si ha evidenza di alcuna ri-

[1] Premio Nobel per la Medicina nel 1976, per i suoi studi sul *kuru* e sulla malattia di *Creutzfeldt-Jacob* (CJ).

[2] Relazione tratta dalla rassegna *"Brain Amyloidoses"*, pubblicata da D. Carleton Gajdusek e C.J. Gibbs jr. in Allan L. Goldstein (Ed.), *"Biomedical Advances in aging"*, Plenum Publishing Corporation, 1990.

sposta immunitaria nei confronti dell'agente causale e non si osservano, al microscopio elettronico, particelle virali riconoscibili nelle sezioni dei cervelli colpiti, mentre nelle encefalopatie da virus convenzionali i virioni si rilevano con estrema facilità. Invece si osservano alterazioni ultrastrutturali nelle membrane plasmatiche che delimitano i vacuoli.

La scoperta della trasmissibilità e dell'eziologia simil-virale del *kuru* e delle demenze pre-senili causate dalla CJ ha portato a definire questi agenti non convenzionali come un nuovo gruppo di microrganismi. A causa delle loro così atipiche caratteristiche fisico-chimiche e biologiche, questo nuovo gruppo di agenti patogeni ha stimolato numerose ricerche e ipotesi per chiarirne la struttura e dare una risposta ai molti paradossi che si osservano nei confronti delle classiche cognizioni di microbiologia e per tentare di risolvere gli enormi problemi clinici ed epidemiologici che tali agenti infettivi pongono.

Attualmente, i miei collaboratori ed io, riteniamo che questi peculiari microrganismi si identifichino con proteine infettive che autoaddensano e autoconformano il precursore di una proteina normalmente prodotta dalle cellule dell'ospite, trasformandola in una forma infettiva (vedi schema seguente relativo alla "generazione *de novo*" dell'agente della *scrapie* a partire da un precursore dell'ospite).

In sintesi, è verosimile che durante l'infezione da *scrapie*, la normale proteina precursore subisca una modificazione configurazionale nella struttura secondaria, in modo da trasformarsi in una forma infettiva, senza che vi sia un cambiamento nella sequenza aminoacidica. Questa modificazione sterica rende la molecola proteasi-resistente e insolubile. Tale forma può poi venire parzialmente degradata e formare la proteina delle placche amiloidi e quando viene purificata durante le procedure di estrazione tende a polimerizzare i monomeri infettanti in fibrille bastoncellari, denominate SAF (fibrille *scrapie* associate).

Nelle preparazioni purificate di SAF non è stato rilevato alcun acido nucleico.

Gli anticorpi, prodotti nel coniglio, verso la proteina amiloide della SAF della *scrapie*, *cross*-reagiscono nella tecnica di *Western*-

| Proteina | Processo | Denominazione |
|---|---|---|
| Proteina precursore della *scrapie* (prodotto normale dell'ospite) | | $PrP33\text{-}45^{c}$* |
| ↓ | Induzione di auto-conformazione, mediante modificazione sterica | ↓ |
| Forma infettiva del precursore | | $PrP33\text{-}35^{sc}$** |
| ↓ | Proteolisi parziale | ↓ |
| Deposito amiloide della *scrapie* | | PrP27 |
| ↓ | Polimerizzazione della proteina in fibrille | ↓ |
| Fibrille *scrapie* associate | | Prioni in forma di aggregati fibrillari (bastoncini) |

* $PrP33\text{-}35^{c}$ = prodotto normale (c = controllo). Peso molecolare = 33-35 KDalton.
** $PrP33\text{-}35^{sc}$ = prodotto infettante (sc = *scrapie*).

*blotting* con le sub-unità proteiche delle SAF che si ottengono purificandole, da cervelli colpiti dalla malattia di *Creutzfeldt-Jakob* o dal *kuru*. D'altra parte, questi antisieri SAF-specifici non reagiscono né con i tipici neurofilamenti né con le proteine delle placche amiloidi che compaiono nella malattia di *Alzheimer*.

## AGENTI CHE NON PROVOCANO ALCUNA RISPOSTA IMMUNITARIA E CHE NON INDUCONO LA COMPARSA DI ANTIGENI NON-*SELF*

Questi agenti non convenzionali invadono inizialmente le cellule del sistema reticolo-endoteliale e in particolare i linfociti splenici a bassa densità. Nonostante ciò, essi non inducono alcuna risposta anticorpale dimostrabile anche quando si utilizzano preparazioni in-

fettanti a titolo molto elevato. Con questa loro incapacità ad indurre una risposta anticorpale anti-virale o comunque diretta verso componenti antigeniche non ospite-derivate o comunque capaci di neutralizzare l'attività dell'agente infettante, tali peculiari "microrganismi" rappresentano elementi unici nel loro comportamento immunologico nell'ambito della microbiologia classica.

L'infezione naturale e sperimentale con questi patogeni, oltre, come detto, a non indurre una risposta anticorpale, non viene modificata nel suo periodo d'incubazione, nella sua progressione, nelle manifestazioni patologiche o nella durata della malattia sino alla morte, dai più diversi trattamenti immunodepressivi che si possono realizzare con l'irradiazione totale del corpo, con la somministrazione di cortisone, di siero anti-leucocitario o di farmaci citotossici.

Inoltre, anche gli studi condotti sia *in vivo*, sia *in vitro* sulla funzionalità dei linfociti, prelevati da animali malati e messi a contatto con preparazioni infettanti a titolo elevato, hanno sempre dato risultati negativi.

Poiché il materiale infettante, ad alto titolo, sia in sospensione grezza sia in preparazioni molto purificate, non è in grado di indurre alcuna risposta anticorpale verso componenti *non-self*, anche impiegando efficaci adjuvanti, risulta evidente che si tratta del primo gruppo di microrganismi in cui è stata dimostrata tale inerzia immunologica e ciò ha fatto nascere l'ipotesi che la replicazione di tali agenti infettanti non implichi la produzione di antigeni *non-self* virus specifici. Al contrario, la loro componente proteica deve essere specificata dai geni dell'ospite e pertanto venire riconosciuta come *self*.

La proteina amiloide della *scrapie* ottenuta da preparazioni altamente purificate di SAF (cioè la proteina del prione $PrP_{27\text{-}30}$) rappresenta quindi la sub-unità delle SAF, che altro non sono se non aggregati fibrillari di tale sub-unità. Tale proteina si aggrega polimerizzandosi in dimeri, tetrameri, ottameri ed esadecameri nello stesso modo in cui si aggrega la differente sub-unità polipeptidica, di 4,1 KDa, nelle formazioni amiloidi tipiche della malattia di *Alzheimer* e del cervello nell'invecchiamento.

È stato possibile produrre nel coniglio anticorpi specifici per tale

proteina amiloide della *scrapie* ($PrP_{27-30}$); questi anticorpi policlonali reagiscono molto bene con le SAF sia in ELISA che con la tecnica del *Western blotting* e ancora con l'*immunogold* elettronmicroscopia. Tali anticorpi anti-SAF della *scrapie cross*-reagiscono marcatamente sia con le SAF del *kuru* che con quelle della malattia C J e della sindrome di *Gerstmann-Sträussler-Scheinker* (GSS), consentendo così un approccio diagnostico alquanto rapido per queste patologie. L'antisiero *cross*-reagisce inoltre con le placche amiloidi del *kuru*, della CJ e, ovviamente, della *scrapie*, mentre non *cross*-reagisce con le placche amiloidi della malattia di *Alzheimer* o del cervello in invecchiamento, suggerendo quindi una diversa eziologia per queste ultime formazioni.

## UNA IMPENSABILE RESISTENZA ALLA INATTIVAZIONE DA AGENTI FISICI E CHIMICI

La dimostrata eccezionale resistenza di questi agenti patogeni non convenzionali ha indotto a modificare, in tutti i Paesi del mondo, le precedenti tecniche di sterilizzazione delle sale chirurgiche e per necroscopia e così pure le precauzioni da usare nella cura dei pazienti dementi e anziani. Infatti, la maggior parte dei disinfettanti organici ad azione blanda, compresi i detergenti e i sali di ammonio quaternario, spesso usati per le disinfezioni, e con questi anche l'acqua ossigenata, la formaldeide, la glutaraldeide, lo psoralene, le sostanze antivirali, l'etere, il cloroformio, lo iodio, il fenolo, l'acetone, l'ossido di etilene, i raggi UV, le radiazioni ionizzanti, l'ultrasonicazione e il calore sono del tutto inadeguati per la sterilizzazione in presenza di agenti non convenzionali; in effetti con alcuni di questi trattamenti è possibile la decontaminazione, ma usando concentrazioni e tempi di contatto molto più elevati rispetto a quelli richiesti per inattivare i batteri e i virus convenzionali. Più recentemente è stato anche dimostrato che tessuti cerebrali infetti, fissati in formalina, sono più resistenti alla inattivazione in autoclave che non cervelli freschi infetti; questo rilievo suggerisce una ulteriore revisione delle precedenti misure di decontaminazione e disinfezione.

Grande attenzione hanno anche ricevuto le segnalazione relative

alla trasmissione iatrogena di questi agenti infettanti, attraverso l'impianto di elettrodi chirurgici, oppure mediante strumenti chirurgici contaminati o ancora a seguito di trapianti di cornea o iniezione di ormone della crescita umano, ottenuto dalla pituitaria, prelevato a cadaveri; anche i trapianti di dura madre, prelevata da cadaveri e "sterilizzata" mediante radiazioni ionizzanti, sono stati causa di trasmissione dell'infezione, così come si pensa possano esserlo gli interventi di odontoiatria.

Gli agenti non convenzionali sono inoltre resistenti a tutte le nucleasi, al ß-propriolattone, all'EDTA e al sodio deossicolato. L'inattivazione si ottiene invece o con temperature estremamente elevate (126-136 °C in autoclave per 60'; oltre 360 °C per 2-3 h in stufa a secco) o con idrossido disodio 1N e ipoclorito al 5%, con tempi di contatto superiori ai 10'.

Tutte queste proprietà atipiche hanno portato a speculare che tali agenti infettivi siano privi di acido nucleico e che siano costituiti da proteine auto-replicanti (forse inducendo una errata traduzione del DNA dell'ospite con la conseguente informazione per la loro sintesi) oppure da frammenti di membrana autoreplicanti, che fungono da stampo per il deposito di membrane plasmatiche anormali, compresi gli stessi agenti infettanti.

La nostra teoria suggerisce invece che si tratti di polipeptidi replicanti che inducono una modificazione configurazionale nella struttura secondaria di una proteina precursore dell'ospite, trasformandola autocataliticamente in una forma infettante. In questo fenomeno di autonucleazione di proteine anomale possono giocare un ruolo anche alcune sostanze minerali, che possono funzionare come nuclei di condensazione per le proteine. In effetti non è insolita la presenza di depositi minerali nei neuroni, sotto forma di idrossiapatiti contenenti alluminio, silicio o altri atomi, nel caso della formazione delle placche amiloidi delle patologie demenziali dell'uomo.

## L'IPOTESI CONCLUSIVA: UN POLIPEPTIDE REPLICANTE E IL SUGGERIMENTO FANTASIOSO DI UN "VIRUS" CHE SI PRODUCE NEL MONDO INORGANICO

Il fatto che esistano malattie delle piante sostenute da patogeni

sub-virali (i viroidi e i virusoidi), costituiti esclusivamente da minuscoli frammenti circolari di RNA, che non codificano alcuna proteina ma che inducono la patologia agendo sul DNA dell'ospite, stimola analogie intellettuali con gli agenti non convenzionali, anche se questi ultimi hanno proprietà diametralmente opposte: assenza di acido nucleico e presenza di proteine infettanti ospite-derivate.

Questi modelli, d'altra parte, sono estremamente utili in quanto ci avvertono della possibilità dell'esistenza di patogeni sub-virali estremamente lontani dalla struttura dei virus convenzionali, e quindi consentono speculazioni su nuovi concetti biologici che contrastano con i dogmi della microbiologia classica.

Secondo la nostra ipotesi, infatti, il monomero che costituisce la forma *scrapie*-alterata della normale proteina-precursore (PrP 35-37$^{sc}$) e il suo prodotto litico cioè la proteina amiloide della *scrapie* ($PrP_{27}$) rappresentano proprio gli agenti infettanti che, come detto, dirigono la propria sintesi mediante modificazione configurazionale della normale proteina precursore prodotta dalle cellule nervose dell'ospite. La polimerizzazione o la cristallizzazione fibrillare di questi monomeri infettanti ($PrP_{27}$) danno origine alle SAF e alle placche amiloidi della *scrapie*, del *kuru* e della malattia di CJ. Solo studi di cristallografia delle proteine possono risolvere i dettagli di tale processo di "modificazione configurazionale", attraverso cui una normale proteina dell'ospite viene trasformata in un agente infettivo auto-inducente, insolubile, proteasi-resistente e amiloide-simile. Nel fenomeno possono anche essere implicate modificazioni post-translazionali alterate, quali legami intra-molecolari, glicosilazioni e fosforilazioni.

Da questa ipotesi ci si aspetta pertanto che gli agenti infettanti responsabili del *kuru*, della CJ, della *scrapie* e della BSE abbiano, in un determinato ospite, la stessa sequenza di aminoacidi: cioè quella che caratterizza la proteina precursore, codificata dal rispettivo gene della pecora, della capra, del visone, del bovino, dell'uomo o degli altri ospiti in cui i patogeni si replicano. Ciò verrà presto verificato sperimentalmente.

L'estrema resistenza al calore, soprattutto dopo fissazione in formalina, può in effetti essere spiegata da agenti infettanti costituiti

da complessi minerali-proteici, come già ipotizzato. Pertanto il nostro atipico agente infettante può semplicemente essere simile a uno stampo cristallino che dirige la condensazione dei monomeri proteici.

Il relatore e i suoi collaboratori preferiscono comunque chiamare tali agenti non convenzionali con il termine "virus", anche se si tratta di un polipeptide autoreplicante, così diverso dai classici virus. D'altra parte, i matematici che operano sui *computers* non hanno esitato ad impiegare il termine "virus" per quelle "infezioni virali" che distruggono la memoria dei *computers*. Il fatto che i cosiddetti "virus" dei programmi dei *computers* non contengano acidi nucleici e che gli acidi nucleici non siano coinvolti in nessun modo nella patologia che causano nei "*software*", non ha evitato agli esperti dei *computers* di chiamarli, a mio parere in modo appropriato, virus.

## BIBLIOGRAFIA


Beck E., Daniel P.M., Davey A.J., Gajdusek D.C., Gibbs C.J. Jr. (1982) The pathogenesis of spongiform encephalopathies: an ultrastructural study, *Brain 105,* 775-786.

Bolton D.C., Meyer R.K., Prusiner S.B. (1985) Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol., 53,* 596-606.

Braig H.R., Diringer H. (1985) Scrapie: concept of a virus induced amyloidosis of the brain. *Eur. J. Mol. Biol., 4,* 2309-2311.

Brown P., Gajdusek D.C., Gibbs C.J. Jr., Asher D.M. (1985) Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. *N. Engl. J. Med., 313,* 728-731.

Brown P., Coker-Vann M., Pomeroy B.S., Asher D.M., Gibbs C.J. Jr., Gajdusek D.C. (1986) Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by Western blot identification of marker protein in human brain tissue. *N. Engl. J. Med., 314,* 547-551.

Brown P., Rohwer R.G., Gajdusek D.C. (1986). Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J. Infect. Dis. 153,* 1145-1148.

Brown P., Wolf A., Liberski P.P., Gajdusek D.C. (1990) Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival above 360 °C: practical and theoretical implications, *J. Infect. Dis.*, in press

Denning P.J. (1988) The science of computing. Computer viruses. *Am. Sci., 76,* 1390-1392

Diringer H., Gelderblom H., Hilmert H., Ozel M., Edelbluth C., Kimberlin R.H. (1983). Scrapie infectivity, fibrils, and low molecular weight protein. *Nature (Lond.), 306,* 476-478.

Gajdusek D.C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of Kuru. *Science, 197,* 943-960.

Gajdusek D.C. (1989). Unconventional viruses causing spongiform encephalopathies, in: Virology (B.N. Fields *et al.*, eds.) 2nd edition, Raven, New York.

Gajdusek D.C., Zigas V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of Kuru in the native population., *N. Engl. J. Med., 257,* 974-978.

Gibbs C.J. Jr., Gajdusek D.C., Latarjet R. (1977). Unusual resistance to UV and ionizing radiation of the viruses of Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie (unconventional viruses), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75,* 6268-6270.

Hope J., Reekie L.J.D., Hunter N., Multhaup G., Beyreuther K., White H., Scott A.C., Stack M.J., Dawson M., Wells G.A.H. (1988) Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated protein., *Nature, 366,* 390-392.

HUNTER G.D., COLLINS S.C., MILLSON G.C., KIMBERLIN R.H. (1976) Search for scrapie-specific RNA and attempts to detect an infectious DNA or RNA. *J. Gen. Virol., 32,* 157-162.

KITAGUCHI N., TAKAHASHI Y., TOKUSHIMA Y., SHIOJIRI S., ITO H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature (Lond.), 331,* 530-532.

KITRAMOTO T., TATEISHI J., TASHIMA T., TAKESHITA I., BARRY R.A., DEARMOND S.J., PRUSINER S.B. (1986). Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol., 20,* 204-208.

MASTERS C.L., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR. (1981) Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstman-Sträussler syndrome, with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain, 104,* 559-588.

MCPHERSON A., SCHLICHTA P. (1988). Heterogeneous and epitaxial nucleation of protein crystals on mineral surfaces. *Science, 239,* 385-387.

MERZ P.A., SOMERVILLE R.A., WISNIEWSKI H.M., MANUELIDIS L., MANUELIDIS E.E. (1984). Scrapie associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature (Lond.), 306,* 474-476.

MULTHAUP G., DIRINGER H., HILMERT H., PRINZ H., HEUKESHOVEN J., BEYREUTHER K. (1985). The protein component of scrapie-associated fibrils is a glycosilated low molecular-weight protein. *Eur. J. Mol. Biol., 4,* 1495-1501.

NARANG H.K., ASHJER D.M., GAJDUSEK D.C. (1988) Evidence that DNA is present in abnormal tubulofilamentous structures found in scrapie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85,* 3575-3579.

OESCH B., WESTAWAY D., WÄLCHLI M., MCKINLEY M.P., KENT S.B.H., AEBERSOLD R., BARRY R.A., TEMPST P., TEPLOW D.B., HOOD L.E., PRUSINER S.B., WEISSMANN C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell, 40,* 735-746.

PRUSINER S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science, 216,* 136-144.

ROBERTSON H.D., BRANCH A.D., DAHLBERG J.E. (1985) Focusing on the nature of the scrapie agent. *Cell, 40,* 725-727.

SAFAR J., CERONI M., PICCARDO P., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J.JR. (1989) Scrapie precursor proteins: antigenic relationship between species and immunocytochemical localization in normal, scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease brains, (in press).

SAFAR I., WANG W., PAOGETT M.P., CERONI M., PICCARDO P., ZUPF D., GIBBS C.J.JR., GAJDUSEK D.C. (1989) Molecular mass, biochemical composition and physicochemical behaviour of the infectiuos form of the scrapie precursor protein monomer, (in press).

TAYLOR D.M., MCCONNEL I. (1988) Autoclaving does not decontaminate formal-fixed scrapie tissues. *Lancet, 1,* 1463-1464.

WILESMITH J.W., WELLS G.A.H., CRANWELL M.P., RYAN J.B.M. (1988) Bovine spongiform encephalopaty: epidemiological studies. *Vet. Rec., 123,* 638-644.

M. POCCHIARI

# RISCHIO DI TRASMISSIONE E POSSIBILE PREVENZIONE DELLE ENCEFALOPATIE SPONGIOSE SUBACUTE

Istituto di Patologia Generale, Università Cattolica, Roma

## TRASMISSIONE NATURALE

I meccanismi di trasmissione naturale delle encefalopatie spongiose subacute sono, in buona parte sconosciuti e pertanto è difficile, se non impossibile, a volte, prevenire la diffusione della malattia.

Le encefalopatie spongiose subacute (per una loro approfondita descrizione vedi Pocchiari e coll., 1988 a) sono causate da un agente trasmissibile non ancora identificato, chiamato virus lento non convenzionale da alcuni studiosi (Gajdusek, 1977), prione da altri ancora (Dickinson e Outram, 1979) o semplicemente agente infettivo (Pocchiari e Masullo, 1985).

Tralasciando le polemiche sulla natura dell'agente infettivo (per una obiettiva revisione della letteratura vedi Brunori e coll., 1988), le sue caratteristiche biologiche e chimico-fisiche sono tuttavia uniche nel mondo dei microrganismi. Infatti, questi agenti infettivi sono apparentemente privi di acidi nucleici, non stimolano alcuna risposta infiammatoria o immunologica e sono inoltre molto resistenti al calore (sono completamente inattivati solo in autoclave a 132 °C per 1 ora) ed alla maggior parte dei comuni disinfettanti (alcool, etere, cloroformio, formalina, etc.; per una revisione esaustiva vedi Asher e coll., 1986; Gajdusek, 1977; Kimberlin e coll., 1983; Brown e coll., 1986).

Inoltre c'è bisogno di una predisposizione genetica dell'individuo perché la malattia possa svilupparsi. Infatti vi è almeno un gene (chiamato *sinc* nel topo e *sip* nella pecora) che regola la velocità di replicazione, e quindi il tempo di incubazione della malattia (Dickinson e Outram, 1979). Il gene ha due alleli, *s7* e *p7*. Alcuni topi (l'animale meglio studiato) sono omozigoti in *s7* e hanno pertanto un breve (*short*) tempo di incubazione quando sono inoculati con

la maggior parte dei ceppi di *scrapie*. Altri topi sono omozigoti in *p7* con conseguente tempo di incubazione prolungato.

Incrociando topi *s7s7* con topi *p7p7* si ottengono degli ibridi *s7p7* che presentano un tempo di incubazione intermedio. Nella pecora si verifica una situazione simile a quella descritta nel topo: le pecore omozigote in *pA* hanno un tempo di incubazione molto lungo e, a volte, sopravvivono all'infezione, al contrario delle omozigote in *sA* e delle eterozigote *sA/pA* (Foster e Dickinson, 1988). In condizione di infezione naturale, le pecore *pApA* potrebbero dimostrarsi refrattarie alla malattia della *scrapie* nel corso della loro vita.

L'organo bersaglio di questi agenti non convenzionali è il sistema nervoso centrale, sebbene il virus si replichi anche negli organi linfopoietici (milza, linfonodi) e si trovi anche nel sangue (Diringer, 1984; Casaccia e coll., 1989) ed in altri tessuti (Hadlow e coll., 1974, 1982; Asher e coll., 1985). Gli ospiti naturali del virus lenti non convenzionali sono l'uomo e gli ovini (soprattutto la pecora).

La *scrapie* della pecora è conosciuto in Europa fin dall'inizio del XVIII secolo (Parry, 1983), diffondendosi con molta probabilità da allevamenti di pecore Merinos della Spagna al centro Europa dove ha causato, in alcuni periodi, la distruzione di gran parte di greggi.

Già nel 1830, in una lunga ed accurata descrizione della "nevralgie lombaire" (così era conosciuta in quel periodo la *scrapie* in Francia), Girard afferma come alcuni studiosi fossero convinti che la *scrapie* si trasmettesse per "contagio" mentre altri considerassero la *scrapie* una malattia "ereditaria". Queste due diverse teorie, postulate più di 150 anni fa, erano il frutto di una attenta osservazione epidemiologica che risulta essere corretta anche oggi. La trasmissione naturale della *scrapie* avviene infatti soprattutto dalla pecora all'agnello con una modalità che può sembrare ereditaria. L'agnello nato da una genitrice infetta (ma non necessariamente malata) ha un'alta possibilità di infettarsi con l'agente della *scrapie* o dopo la nascita, o addirittura in utero (Dickinson e coll., 1974; Hourrigan e coll., 1979). Alcuni studi hanno dimostrato che gli agnelli contraggono la *scrapie* anche se tolti immediatamente dopo il parto dalla madre infetta (Hourrigan e coll., 1979). Questo dato suggerirebbe che l'infezione venga contratta in utero. Sebbene que-

sto sia il meccanismo attraverso il quale la *scrapie* si tramette da pecora a pecora, è pur vero che basta l'introduzione di un animale infetto in un gregge esente da *scrapie* per osservare, nell'arco di un paio d'anni, la diffusione della malattia (Dickinson e coll., 1974). E' stato postulato che le pecore adulte contraggano l'infezione mangiando placente infette (Pattison e coll., 1972).

Da quanto esposto ne consegue che l'unica *prevenzione* possibile è quello di sacrificare al più presto le pecore infette e tutta la loro progenie. Alcuni studiosi hanno addirittura suggerito l'eliminazione completa del gregge. In un programma di debellamento della *scrapie* si è proposto di selezionare quelle razze di pecore che presentino il gene *sip* omozigote in *pA*, che siano cioè refrattarie all'infezione naturale da parte della maggior parte dei ceppi di *scrapie* (Dickinson e coll., 1988).

Al contrario della *scrapie*, la trasmissione naturale nell'uomo della malattia di *Creutzfeldt-Jakob* (CJ) (Kirshbaum, 1968; Mizutani e Shiraki, 1985) e della sua variante anatomo-clinica, la sindrome di *Gerstmann-Sträussler* (GSS) (Masters e coll., 1981), è del tutto sconosciuta.

La CJ è diffusa in tutto il mondo (Masters, 1987), ma con un'incidenza molto bassa, inferiore ad 1 caso per milione di abitanti (Brown, 1988; Masullo e coll., 1988). Nel 5% dei casi ha, inoltre, una distribuzione familiare di tipo autosomico dominante (Brown, 1988).

Da questi dati, epidemiologici emergono due possibili meccanismi di trasmissione della malattia. La prima ipotesi è che l'agente infettivo sia presente nella maggior parte della popolazione ma che la malattia si manifesti solo negli individui predisposti geneticamente. La seconda che la malattia sia dovuta ad una alterazione spontanea di una proteina di membrana, la PrP, che ha importanti, sebbene ancora sconosciute, funzioni nel regolare l'omeostasi cellulare (vedi Brunori e coll., 1988). La PrP che ha subita questa alterazione spontanea (PrP "patologica") è successivamente in grado di modificare, per esempio con un meccanismo di tipo autocatalitico (Brunori e Talbot 1985), altre PrP "normali".

La PrP "patologica" sarebbe anche capace di modificare le PrP "normali" di altri individui se viene accidentalmente iniettata in soggetti sani o in animali da esperimento.

Nel corso della malattia, infatti la PrP subisce una modificazione strutturale (non ancora conosciuta!) che la rende inattaccabile dai normali processi catabolici e la fa pertanto cumulare all'interno delle cellule nervose e nel neuropilo circostante fino a provocare la morte cellulare (Diringer e coll., 1986). In alcuni casi la PrP si accumula sotto forma di placche di amiloide facilmente osservabili all'esame istologico del sistema nervoso centrale (vedi figura). Con molta probabilità, la PrP è il prodotto del gene che regola il tempo di incubazione (*sinc* nel topo, *sip* nella pecora) e, secondo alcuni ricercatori, potrebbe fungere da recettore cellulare per l'agente infettivo (Hope e Hunter, 1988).

Studi caso-controllo non hanno dimostrato alcun fattore di rischio nei soggetti affetti (Matthews, 1989), se non una limitata maggior frequenza di interventi chirurgici e di traumi cranici (Kondo e Kuroiwa, 1982).

Qualche studioso ha postulato che l'uomo possa infettarsi attraverso procedure odontoiatriche (Will e Matthews, 1982) o con il consumo di carni di pecora infetta (Alter e coll., 1977; Lo Russo e coll., 1980; Davanipour e coll., 1985), specie in quelle popolazioni che hanno come abitudine alimentare di mangiare il cervello e/o le interiora d'agnello poco cotte (per es., fritte) (Goldberg e coll., 1979). Entrambe queste teorie non sono state però mai dimostrate in studi controllati su un gran numero di pazienti affetti da malattia di *Creutzfeldt-Jakob* (Kondo e Kuroiwa, 1982; Brown e coll., 1987; Matthews, 1989). Inoltre, la comparsa della malattia in un soggetto vegetariano (Matthews e Will, 1981) fa supporre che il meccanismo di trasmissione con carne contaminata non sia da prendere in seria considerazione.

*Prevenire* la malattia nei casi sporadici è pressoché impossibile. Nei casi familiari la presenza di mutazioni puntiformi (le più frequenti sono: in posizione 102, leucina al posto di prolina [Hsiao e coll., 1989; Goldgaber e coll., 1989], ed in posizione 200, lisina invece di glutamina [Goldgaber e coll., 1989]) nel gene che codifica per la proteina PrP fa sperare in una futura *prevenzione* attuabile riconoscendo queste mutazioni durante i primi mesi di vita intrauterina.

## TRASMISSIONE ACCIDENTALE

Le trasmissioni accidentali delle encefalopatie spongiose subacute sono avvenute sia da animale a animale (pecora-pecora, pecora-visone e pecora-bovino) che da uomo a uomo (Tabella 1). Non è invece provata la trasmissione della *scrapie* della pecora all'uomo, sebbene vi siano stati nel passato numerosi lavori che ipotizzassero il contrario (vedi sopra). C'è, tuttavia, oggi, una certa preoccupazione per la teorica possibilità che l'uomo possa infettarsi mangiando le carni (specie il cervello ed alcuni organi interni) del bovino affetto da encefalopatia spongiosa (Holt e Phillips, 1988). Il rischio per l'uomo, inoltre, è aumentato dal fatto che numerosi farmaci vengono estratti dagli organi del bovino.

Il primo caso di trasmissione accidentale di encefalopatia spongiosa subacuta di cui si è a conoscenza risale al 1937 quando in seguito ad una vaccinazione di massa per prevenire l'encefalomielite infettiva degli ovini (*louping-ill*), più di mille pecore vennero accidentalmente contaminate con il virus della *scrapie* (Gordon, 1946). Il lotto di vaccino incriminato era stato preparato da 112 cervelli di pecora inattivati con formalina (0,35%). Di questi cervelli, 8 provenivano da agnelli di razza Cheviot le cui madri erano affette da *scrapie*. Questa drammatica esperienza dimostrò che l'agente della *scrapie* era resistente alla formalina, che era trasmissibile per via sottocutanea (via di somministrazione del vaccino) e che aveva un tempo di incubazione di circa due anni (il vaccino era stato somministrato nel 1935).

Una seconda trasmissione accidentale della *scrapie*, questa volta al visone (*transmissible mink encephalopathy*, TME), fu nel 1947 in un allevamento del Wisconsin di oltre 5000 animali dove la malattia colpì e uccise il 100% dei visoni al di sopra dell'anno di età (Hartsough e Burger, 1965). Una simile epidemia di TME avvenne nel 1961 e nel 1963: in alcuni allevamenti vennero uccisi tutti i visoni adulti, mentre in altri solo il 10-30%. La causa della malattia si fece risalire alla contaminazione accidentale con l'agente della *scrapie* del cibo con cui erano stati nutriti i visoni (Hartsough e Burger, 1965). Nel loro lavoro, Hartsough e Burger (1965) dichiararono tuttavia che, in alcuni casi, non era stata provata la presenza

di carni ovine nel cibo incriminato, ma che i visoni erano stati nutriti con carni provenienti da bovini ammalati, e quindi non utilizzabili per il consumo umano. Dopo di allora la TME è comparsa sporadicamente in allevamenti nel Canada (Hadlow e Karstad, 1968), in Germania (Hartung e coll., 1970) ed in Finlandia (Marsh, 1976). Nel 1985, la malattia è apparsa in un allevamento di visoni del Wisconsin, il cui proprietario afferma di non aver mai nutrito i suoi animali con avanzi di carne ovina, ma solo con carne proveniente da vacche (per il 95%) e da cavalli (Marsh, 1990). Questo dimostrerebbe la possibilità che l'encefalopatia spongiosa del bovino (BSE) colpisca occasionalmente, da più di 40 anni, anche alcuni capi di bestiame statunitensi. La TME non si propaga da visone a visone; ne è prova il fatto che, all'interno di un allevamento, si ammalano, dopo un periodo di incubazione di circa un anno, solo gli animali che sono stati nutriti con cibo infetto e non quelli più giovani, nati dopo l'avvenuta contaminazione (Hartsough e Burger, 1965). Questi dati dimostrano che il visone non è un ospite naturale dei virus lenti non convenzionali, ma che ne rimane affetto solo occasionalmente, in seguito alla trasmissione accidentale dell'agente infettivo.

Recentemente, una nuova forma di encefalopatia spongiosa, dovuta ad una accidentale trasmissione della *scrapie* ai bovini, è comparsa in alcuni allevamenti britannici (Wilesmith e coll., 1988) assumendo in pochi mesi forma epidemica con punte di circa 500 nuovi casi a settimana (Wilesmith, 1990). La malattia, chiamata encefalopatia spongiosa del bovino (BSE), ha esito inevitabilmente fatale in pochi mesi. Il bovino si infetta per via alimentare con mangimi contenenti farina di carne e ossa contaminati con l'agente della *scrapie* (Morgan, 1988). Dal 1988 il Governo Britannico ha vietato la preparazione di mangimi contenenti proteine animali per l'alimentazione dei ruminanti (MAFF, 1988). Questo provvedimento diminuirà l'incidenza della BSE a partire dal 1992 fino alla sua totale scomparsa nel 1994 (Wilesmith e coll., 1988), se nel frattempo non si instaureranno altre vie di trasmissione dell'agente infettivo tra i bovini (per es., trasmissione della malattia tra madre e figlio) così come accade per la *scrapie* della pecora. In una recente nota, Aldhous (1990) ha riportato la comparsa della BSE in un vitello nato

dopo il divieto di nutrire i ruminanti con proteine animali. Questo dato, sebbene ancora da confermare, fa pensare che la malattia, al contrario di quello che accade tra i visoni, possa propagarsi naturalmente tra i bovini. La BSE ha una diffusione, fino ad oggi, limitata esclusivamente alla Gran Bretagna ed all'Irlanda. Recentemente sono stati descritti due casi di BSE in Oman in bovini importati dal Regno Unito (Carolan e coll., 1990). Non è stata mai descritta in altri Paesi, sebbene vi sia il sospetto che possa essere presente, in misura molto limitata, in USA (vedi sopra; Marsh, 1990) ed in Francia (Anonimo, 1990). il divieto di introdurre, nel mangime dei ruminanti, proteine di origine animale è la migliore *prevenzione* per controllare la diffusione della BSE nel Regno Unito. Purtroppo, queste misure precauzionali non sono state adottate da altri Paesi, tra cui l'Italia, con conseguente alto rischio di comparsa della malattia.

La malattia che nell'uomo può considerarsi causata nella sua totale espressione da una trasmissione accidentale è il *kuru* (Gajdusek e Zigas, 1957). Questa è una malattia esotica, oggi quasi completamente scomparsa, che colpiva gli abitanti di lingua Fore di Papua-New Guinea (Gajdusek, 1977).

Il *kuru* si trasmetteva da individuo a individuo attraverso pratiche ritualiche di tipo cannibalico che comprendevano anche la manipolazione e lo spargimento su tutto il corpo degli organi del defunto (Farquhar e Gajdusek, 1981). Dal punto di vista sperimentale sia la via orale che quella sottocutanea (il corpo degli indigeni era con molta probabilità ricoperto da ulcerazioni e scarificazioni di ogni genere) sono in grado di trasmettere la malattia negli animali da esperimento (Gibbs e coll., 1980; Prusiner e coll., 1985).

Due fatti confermano che il *kuru* si trasmetteva attraverso pratiche di cannibalismo. Il primo è che solo le donne e i bambini di entrambi i sessi, i soli che praticavano le pratiche ritualiche, venivano colpiti dalla malattia. Il secondo è che con la soppressione da parte delle autorità governative del cannibalismo il *kuru* è andato via via scomparendo (Gajdusek, 1977). Oggi è presente solo in qualche caso sporadico in cui la malattia è comparsa dopo oltre trenta o 40 anni di incubazione (Klitzman e coll., 1984). A detto degli stessi indigeni il *kuru* comparve nella loro popolazione sol-

tanto pochi decenni prima dell'arrivo di Gajdusek e Zigas negli anni '50. Questo fa supporre che la malattia sia iniziata in seguito alla comparsa di un caso sporadico di *Creutzfeldt-Jakob* che è stato poi, attraverso le pratiche cannibaliche, la fonte dell'infezione per il resto degli indigeni (Gajdusek, 1977).

La ovvia *prevenzione* per la diffusione del *kuru* è stata quella di "civilizzare" gli indigeni, vietarne le pratiche cannibaliche, ed eliminare così il meccanismo responsabile dell'infezione.

In pochi e documentati casi, la malattia di *Creutzfeldt Jakob* è stata trasmessa attraverso procedure mediche (Brown, 1988). Il primo di questi drammatici casi è stato in seguito ad un trapianto di cornea da un soggetto affetto da CJ ad una giovane donna di 36 anni che, dopo 18 mesi di incubazione, ha contratto la malattia (Duffy e coll., 1974).

Qualche anno più tardi Bernoulli e coll., (1977) descrissero due nuovi casi di trasmissione accidentale della CJ attraverso l'impianto intracerebrale di elettrodi per la registrazione stereoelettroencefalografica. Gli elettrodi incriminati erano stati usati precedentemente in un caso di CJ e successivamente sterilizzati con procedure convenzionali (70% di etanolo e vapori di formaldeide) prima di essere impiantati in due giovani di 18 e 24 anni. La malattia si manifestò dopo 16 mesi nel primo caso e 20 mesi nell'altro.

Altri 4 casi di trasmissione iatrogena sono avvenuti in seguito ad interventi neurochirurgici (Foncin, 1980; Will e Matthews, 1982). In questi casi la malattia comparve dopo 18-20 mesi dall'intervento subito.

Più recentemente sono stati descritti 3 casi (25, 28 e 27 anni) di trasmissione accidentale attraverso il trapianto di dura madre liofilizzata (Thadani e coll., 1988; Nisbet e coll., 1989; Masullo e coll., 1989). Il tempo di incubazione in questi soggetti, compreso tra i 19 e i 44 mesi, non era molto dissimile dai precedenti casi iatrogenici sopra descritti.

Tutti questi pazienti sono stati accidentalmente inoculati con materiale infetto per via intracerebrale o intraoculare; studi sulla trasmissione sperimentale della CJ hanno dimostrato che nello scimpanzé l'inoculazione intracerebrale determina un tempo di incubazione simile a quello osservato nei casi iatrogeni umani (Gajdusek,

1977). La via intraoculare è altrettanto efficace, almeno nei roditori (Fraser, 1982; Kimberlin e Walker, 1986a).

Nel 1985 sono stati descritti i primi 4 casi di tramissione accidentale della CJ per via periferica (intramuscolare, sottocutanea) in seguito a terapia sostitutiva con ormone della crescita estratto da ipofisi umane (Brown e coll., 1985a). Negli anni successivi altri 8 casi si sono aggiunti ai precedenti, per un totale di 11 casi (Brown, 1990) (vedi tabella 2).

**Tabella 1: Trasmissione e prevenzione delle encefalopatie spongiose subacute**

| | | |
|---|---|---|
| *Trasmissione naturale* | uomo-uomo; | t. sconosciuta |
| | animale-animale; | t. laterale<br>t. verticale |
| Prevenzione:<br>molto difficile. | — selezione di razze di pecora refrattarie alla *scrapie*. | |
| *Trasmissione accidentale* | uomo-uomo: | cannibalismo (*kuru*)<br>elettrodi stereo-EEG<br>trapianto di cornea<br>trapianto di *dura mater*<br>interventi neurochirurgici<br>terapia con hGH |
| | animale-animale: | vaccino *"louping ill"*<br>mangime infetto<br>(TME, BSE) |
| | animale-uomo: | nessuna evidenza certa ma possibile, specie se si selezionano ceppi di virus che possano facilmente attraversare la barriera animale-uomo |

Prevenzione: **possibile**
- — abolizione nel cannibalismo
- — non usare mangimi contenenti proteine animali per nutrire animali domestici
- — evitare donazioni di organi da soggetti con sospette malattie neurologiche o psichiatriche
- — usare accorgimenti particolari per estrarre da tessuti umani o animali farmaci ad uso umano o veterinario
- — decontaminare correttamente gli strumenti chirurgici: autoclave 134 °C per 1 ora, immersione in NaOH, 1 N per 12 ore
- — terapia preventiva (es., polianioni)

La somministrazione dell'ormone della crescita (hGH) avviene o per via sottocutanea o per via intramuscolare con una frequenza di circa tre volte a settimana (Brook, 1989). La durata della terapia varia da soggetto a soggetto, ma nella maggior parte dei casi si protrae per diversi anni. È quindi difficile stabilire con esattezza il momento in cui questi pazienti siano stati infettati con l'agente della CJ (vedi tabella 2).

**Tabella 2: La malattia di *Creutzfeldt-Jakob* in pazienti trattati con ormone della crescita umano (hGH) di tipo estrattivo**

| Età/sesso | anno | Tempo di incubazione (anni) Min. | Max. | Paese di origine |
|---|---|---|---|---|
| 16/F* | (1979) | ? | (10) | USA |
| 22/M | 1983 | 6 | 14 | USA |
| 22/F | 1984 | 8 | 12 | Inghilterra |
| 20/M | 1984 | 4 | 18 | USA |
| 32/M | 1984 | 15 | 21 | USA |
| 32/F | 1985 | 12 | 15 | N. Zelanda |
| 37/M | 1986 | 19 | 22 | USA |
| 20/M | 1987 | 2 | 13 | Inghilterra |
| 28/M | 1988 | 11 | 21 | Brasile |
| 26/M | 1988 | 5 | 20 | USA |
| 32/F | 1988 | 15 | 28 | USA |
| 40/F** | 1987 | 12 | 13 | Australia |

* Questa paziente è morta per altre cause durante la fase preclinica della malattia di *Creutzfeldt-Jakob*
** Questa paziente è stata trattata con gonadotropina di tipo estrattivo.

L'ormone della crescita viene estratto da lotti di 500-2000 ipofisi umane prelevate al riscontro autoptico di soggetti apparentemente esenti da malattie di tipo trasmissibile. Secondo una stima pubblicata da Brown e coll. (1985), si avrebbe una ghiandola proveniente da un paziente con CJ ogni 10.000 ipofisi raccolte. Pertanto, il rischio di avere un'ipofisi contaminata con l'agente della CJ in un lotto di ghiandole per la purificazione dell'hGH, sarebbe di 1-2 ogni 10 lotti di ghiandole. Sebbene nell'uomo non si conosca il titolo dell'infettività dell'ipofisi, si suppone che la distribuzione dell'agente infettivo sia simile a quella che si osserva nella pecora affetta da *scrapie* naturale, in cui il titolo di infettività è di circa 100-1000 volte inferiore a quello misurato nel cervello (Hadlow e coll., 1974, 1982). Dato che nel cervello umano si ha un titolo di circa $10^3$-$10^6$ $DL_{50}$ per grammo di tessuto (Brown e coll., 1985b), si assume che ogni ipofisi proveniente da un paziente deceduto per CJ abbia da 1 a 10.000 particelle infettanti (Pocchiari e coll., in stampa). Tale dovrebbe essere quindi l'infettività presente in un lotto di ipofisi accidentalmente contaminato con l'agente della CJ. Nel procedimento di estrazione e di purificazione dell'hGH con il metodo di Lumley-Jones, in uso dal 1979 fino alla comparsa dei primi casi di CJ, rimuove circa 10.000 particelle di virus (Pocchiari e coll., in stampa), così che il livello di infettività finale presente nell'hGH purificato da un lotto contaminato oscilla da un minimo di $10^4$ ad un massimo di 1 $DL_{50}$.

Tenendo presente che un lotto su 10 potrebbe essere contaminato e che da ogni lotto si ricava tanto hGH da essere suddiviso in circa 10.000 fiale da 4 UI l'una, si ricava che la possibilità che una di queste sia contaminata è tra 1 ogni 50.000 ad 1 ogni 500 milioni di fiale. Ogni paziente riceve in media 3 fiale a settimana per circa 5 anni (Brook, 1989), il che equivale ad un totale di 780 fiale. Pertanto, la probabilità che un paziente che è stato sottoposto a terapia con hGH preparato secondo il metodo di Lumley-Jones abbia ricevuto una fiala contaminata è di 1 su 64 nella peggiore delle ipotesi e di 1 su 640.000 nella migliore (Pocchiari e coll., in stampa). Uno studio epidemiologico eseguito in USA ha valutato che il rischio di contrarre la CJ è di 1 caso su 150 nella popolazione trattata con hGH nello stesso periodo di coloro che hanno sviluppato

la malattia (Fradkin e coll., in stampa). Questa stima è simile alla peggiore ipotesi teorizzata nello studio di Pocchiari e coll. (in stampa). Bisogna però ricordare che prima del 1977 l'hGH veniva estratto e purificato con metodiche meno sofisticate di quelle introdotte da Lumley-Jones e pertanto è possibile che una maggiore quantità di virus fosse presente nell'estratto finale.

L'esordio della malattia e la successiva sintomatologia clinica di questi 11 giovani pazienti erano in prevalenza caratterizzati da disturbi di tipo cerebellare con la comparsa solo tardiva di deterioramento intellettivo (Brown, 1988). La notevole somiglianza delle manifestazioni cliniche fa supporre che questi pazienti siano stati accidentalmente infettati con tre ceppi di CJ. È probabile quindi che siano stati tre lotti di hGH ad essere contaminati dall'agente della CJ e quindi ad essere responsabili della trasmissione accidentale della malattia (Brown, 1988).

Il lungo tempo di incubazione della malattia in questi soggetti è dovuta sia alla via di inoculazione dell'agente infettivo (intramuscolare o sottocutanea) e probabilmente dalla bassa carica virale del prodotto incriminato.

Prevenire la trasmissione accidentale delle encefalopatie spongiose subacute è possibile e deve essere attuata in ogni caso in cui vi sia anche il minimo rischio teorico.

L'esperienza che è scaturita da questi eventi ha allargato le nostre conoscenze sulle caratteristiche biologiche e chimico-fisiche dei virus lenti non convenzionali ed oggi abbiamo più di un mezzo per poterli inattivare e/o rimuovere dai prodotti biologici e dagli strumenti chirurgici e odontoiatrici (Pocchiari, 1990).

L'abolizione del cannibalismo e di tutte le pratiche ritualiche ad esso connesso si può considerare come la prima misura di prevenzione contro la diffusione del *kuru* tra gli indigeni della Nuova Guinea.

Il passo successivo è stato quello di sensibilizzare la classe medica ad evitare i trapianti di organi o le trasfusioni di sangue da soggetti affetti da deterioramente intellettivo e, per precauzione, da pazienti con sospette malattie neurologiche e psichiatriche (Gajdusek e coll., 1977).

Notevoli misure precauzionali sono state adottate dal Governo

inglese dopo la comparsa della BSE in gran parte degli allevamenti dei bovini britannici. Le precauzioni sono state rivolte sia ad impedire la diffusione della BSE tra gli animali con l'abolizione dei mangimi contenenti proteine di origine animale, sia a prevenire la pur remota e teorica possibilità che l'agente della BSE possa infettare l'uomo. Infatti, nel Regno Unito è stata vietata la vendita di latte e di carne provenienti da bovini ammalati (Southwood, 1989) e, come maggior misura cautelativa, è stata vietata la vendita del cervello e delle interiora bovine, anche se provenienti da animali sani (MAFF, 1989), per il consumo alimentare umano. Purtroppo queste misure preventive non sono state adottate da altri Paesi, compresa l'Italia, in cui c'è il rischio di un'epidemia di BSE. Infatti, la *scrapie* della pecora, contaminante del mangime per i ruminanti, è diffuso in molti Paesi ed è presente, sebbene forse in misura più contenuta, anche in Italia (Cravero e coll., 1977).

Un'altra procedura preventiva di relativa facile applicazione ma scarsamente attuata negli ospedali e nelle cliniche italiane ed estere è la corretta sterilizzazione degli strumenti chirurgici e odontoiatrici. Infatti, le normali procedure usate non sono quasi mai sufficienti per inattivare i virus lenti non convenzionali. Per una corretta sterilizzazione occorre per prima cosa pulire i ferri dagli eventuali residui di tessuti e di sangue tenendoli immersi per almeno 12 ore in una soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 1 N e quindi autoclavarli a 132 gradi centigradi (2 atmosfere) per almeno 1 ora (*Committee on Health Care Issues*, 1985). Solo così si ha la certezza di inattivare completamente ogni eventuale contaminazione con i virus lenti non convenzionali ed essere quindi sicuri di non infettare altri pazienti.

La prevenzione si fa più indaginosa per decontaminare i prodotti biologici di tipo estrattivo per uso terapeutico nell'uomo o negli animali. Sebbene il maggior rischio per l'uomo sia dato da sostanze estratte da tessuti umani, quali l'ormone della crescita, vi è la possibilità, per ora solo teorica, che anche prodotti preparati da tessuti di animali infetti (pecora con *scrapie* o bovino con BSE) contaminino l'uomo. Purtroppo non vi sono delle metodiche di decontaminazione *standard* applicabili ad ogni procedura di estrazione e di purificazione di prodotti biologici, ma è necessario valutare

di volta in volta la natura chimica del prodotto finale (se proteico, lipidico, etc.) e la sequenza dei procedimenti estrattivi usati. Nel caso dell'ormone della crescita, per esempio, il prodotto finale è stato filtrato su ultrafiltri che ritengono particelle di peso molecolare maggiore a 100.000 daltons e successivamente trattato con urea, 6 molare, per 12 ore. Queste due semplici procedure riducono di circa un milione di volte l'infettività della *scrapie* (Pocchiari e coll., 1988b) e, supponendo che l'agente della CJ abbia un comportamento simile, portare quasi a zero la possibilità che l'ormone della crescita rimanga contaminato (Pocchiari e coll., in stampa). Per altri prodotti, quale ad esempio i gangliosidi, è invece possibile usare l'idrossido di sodio che ha un potere inattivante sui virus lenti molto maggiore dell'urea (Di Martino, 1990). L'idrossido di sodio è inutilizzabile invece con prodotti proteici, quale l'ormone della crescita, perché ne idrolizzerebbe la molecola, rendendo il composto inattivo. È possibile usare il trattamento con idrossido di sodio anche per decontaminare la *dura mater* liofilizzata (Diringer e Braig, 1989).

Le procedure descritte fino ad ora servono per prevenire la "introduzione" dell'agente infettivo nell'ospite uomo o animale che sia. Questo perché si è soliti pensare che una volta avvenuta l'infezione non ci sia più nulla che possa fermare l'inesorabile, seppur lenta, replicazione del virus.

Sebbene ciò sia in gran parte vero e prevenire sia meglio che curare, è pur vero che nella *scrapie* sperimentale è possibile ritardare e, a volte sopprimere, la comparsa della malattia trattando gli animali con alcuni polianioni solfati (Ehlers e Diringer, 1984; Farquhar e Dickinson, 1986; Kimberlin e Walker, 1986b) o con anfotericina B (Pocchiari e coll., 1987, 1989a, 1989b).

Queste sostanze hanno la loro maggiore efficacia quando vengono somministrate in un tempo vicino all'inoculazione dell'agente infettivo e il loro effetto diminuisce drasticamente quanto più tardi si somministrano (Farquhar e Dickinson, 1986) fino a divenire totalmente inefficaci dopo la comparsa dei segni clinici della malattia (Pocchiari e coll., 1987).

È possibile quindi ipotizzare l'utilizzo di questi farmaci in quei soggetti, animali ed eventualmente nell'uomo, in cui si siano com-

piute delle procedure mediche o chirurgiche sospette o si siano somministrate delle sostanze biologiche probabilmente contaminate.

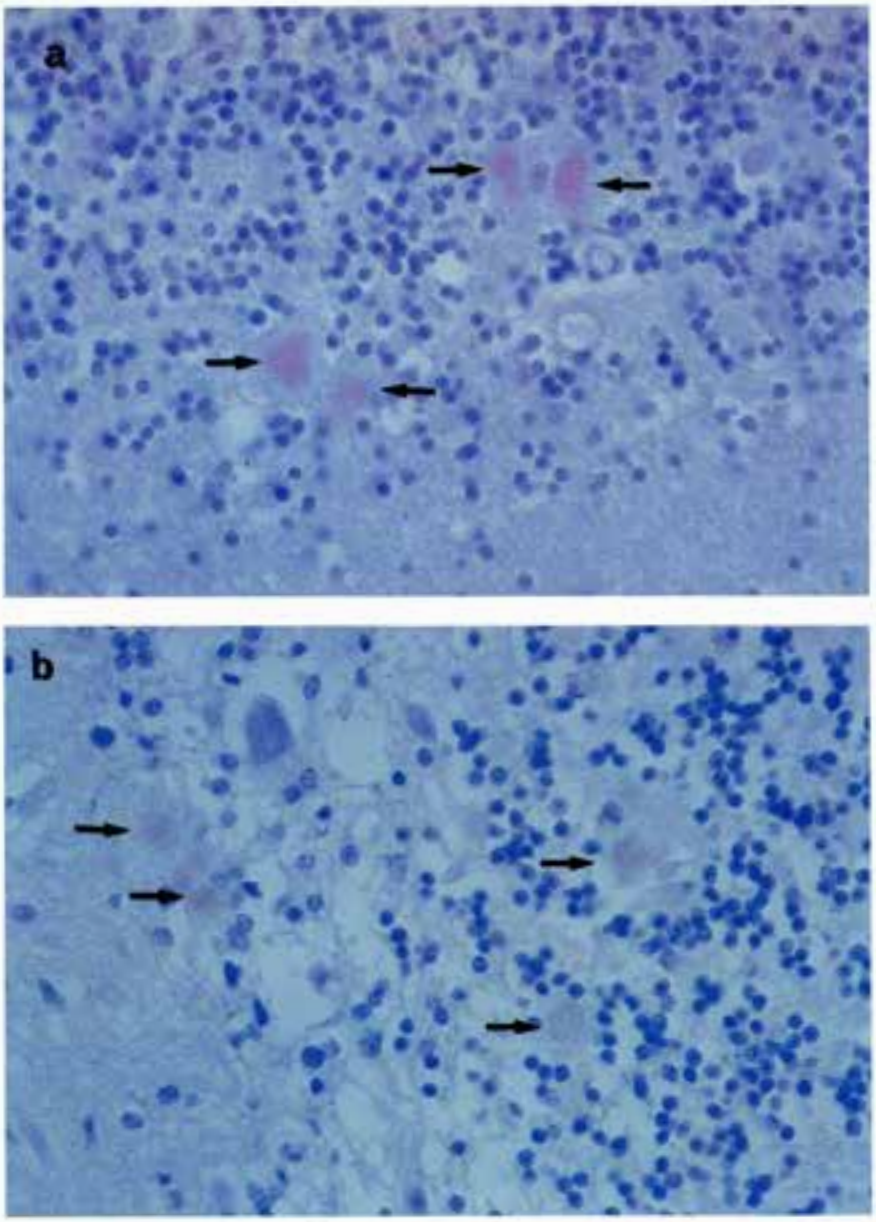



Figura 1: Placche di amiloide (frecce) nella corteccia cerebrale di una paziente affetta da malattia di *Creutzfeldt-Jacob* ($\times 400$). (a) Colorazione PAS; (b) Colorazione immunoistochimica con anticorpo policlonale anti-PrP purificata da cervelli di criceti con *scrapie* sperimentale.

*Si ringrazia il Prof. M. Manfredi dell'Università di Roma "La Sapienza" per la segnalazione del caso ed il Prof. G. Macchi, dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Roma per l'osservazione neuropatologica.*

## BIBLIOGRAFIA


ALDHOUS P.: New fears on transmission. [News]. *Nature, 345*: 280, 1990.

ALTER M., HOENING E., PRATZON G.: Creutzfeldt-Jakob disease: possible association with eating brains. *N. Engl J. Med., 296*: 820-821, 1977.

Anonimo: The unexpected export? [News]. *Nature, 345*: 566, 1990.

ASHER D.M., GIBBS C.J. JR., GAJDUSEK D.C.: Slow viral infections: safe handling of the agent of subacute spongiform encephalopathies. In: Laboratory safety principles and practice, Miller B.M. (ed.), American Society Microbiology, Washington DC, 1986, pp. 59-71.

ASHER D.M., GIBBS C.J. JR., GAJDUSEK D.C.: Subacute spongiform encephalopathies: slow infection of the nervous systems. *Clin. Microb. Newslett, 7*: 129-133, 1985.

BERNOULLI C., SIEGFRIED J., BAUMGARTNER G., REGLI F., ROBINOWICZ T., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR.: Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet, i*: 478-479, 1977.

Brook C.G.D.: Schedules for growth hormone treatment. In: Growth abnormalities, Bierich J.R., Cacciari E., Raiti S., (eds.), Raven Press, New York, 1989, pp. 161-174.

BROWN P.; The clinical neurology and epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease, with special reference to iatrogenic cases. In: Novel infectious agents and the central nervous system, Ciba Foundation Symposium 135, John Wiley & Sons, Chichester, 1988, pp 3-23.

BROWN P.: Transmissible spongiform encephalopathies in humans: kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Schinker disease. *Can. J. Vet. Res., 54*: 38-41, 1990.

BROWN P., CATHALA RAUBERTAS R.F., GAJDUSEK D.C., CASTAIGNE P.: The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob diseases: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology, 37*: 895-904, 1987.

BROWN P., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR., ASHER D.M.: Potential epidemic of Creutzfeldt-Jakob disease from human growth hormone therapy. *N. Engl. J. Med., 313*: 728-730, 1985 a.

BROWN P., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR., ASHER D.M., SULIMA M.P., AMYX H.L.; Synopsis of a 16-year experience in the primary transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. In: Proceedings of Workshop on slow transmissible diseases, Tateishi J., (ed.), Japanese Ministry of Health and Welfare, Tokyo, 1985 b, pp. 27-31.

BROWN P., ROHWER R.G., GAJDUSEK D.C.: Newer data on the inactivation of scrapie virus of Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *J. Infect. Dis., 153*: 1145-1148, 1986.

BRUNORI M., SILVESTRINI M.C., POCCHIARI M., The scrapie agent and the prion hypothesis. *Trends Bioch. Sci., 13*: 309-313, 1988.

BRUNORI M., TALBOT B.: A mechanism for prion replication. *Nature, 314*: 676, 1985.

CAROLAN D.J.P., WELLS G.A.H., WILESMITH J.W.: BSE in Oman. *Vet. Rec., 126*: 92, 1990.

CASACCIA LADOGANA A., XI Y.G., POCCHIARI M.: Levels of infectivity in the blood throughout the incubation period of hamsters peripherally injected with scrapie. *Arch. Virol., 108*: 145-149, 1989.

Committee on Health Care Issues, American Neurological Association: Precautions in handling tissues, fluids, and other contaminated materials from patients with documented or suspected Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol., 19*: 75-77, 1985.

CRAVERO G., GUARDA F., DOTTA U., GUGLIELMINO R.: La "scrapie" in pecore di razza biellese. Prima segnalazione in Italia. La *Clinica Veterinaria, 100*: 1-14, 1977.

DAVANIPOUR Z., ALTER M., SOBEL E., ASHER D.M., GAJDUSEK D.C.: A case-control study of Creutzfeldt-Jakob disease. Dietary risk factors. *Am. J. Epidemiol., 122*: 443-451, 1985.

DICKINSON A.G., OUTRAM G.W.: The scrapie replication-site hypothesis and its implication for pathogenesis. In: Slow transmissible diseases of the nervous system, Prusiner S.B., Hadlow W.J., (eds.), Academic Press, New York, 1979, vol. 2, pp. 13-31.

DICKINSON A.G., STAMPT J.T., RENWICK C.C.: Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol., 84*: 19-25, 1974.

DICKINSON A.G., TAYLOR D.M.: Options for the control of scrapie in sheep and its counterpart in cattle. Proc III world congress on sheep and beef cattle breeding, Paris, 1988, vol. 1, pp. 553-564.

DI MARTINO A.: Attempts to detect evidence of scrapie-associated protein in bovine tissue-derived products. *JAVMA, 196*: 1685-1686, 1990.

DIRINGER H.: Sustained viremia in experimental hamster scrapie, *Arch. Virol., 82*: 105-109, 1984.

DIRINGER H., BRAIG H.R.: Infectivity of unconventional viruses in dura mater. *Lancet, i*: 439-440, 1989.

DIRINGER H., BRAIG H.R., POCCHIARI M., BODE L.: Scrapie-associated fibrils in the pathogenesis of diseases caused by unconventional slow viruses. *Discussions in Neurosciences, 3*: 95-100, 1986.

DUFFY P., WOLF J., COLLINS G., DE VOE A.G., STEETEN B., COWEN D.: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Eng. J. Med., 299*: 692-693, 1974.

EHLERS B., DIRINGER H.: Dextrane sulphate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J. Gen. Virol., 65*: 1325-1330, 1984.

FARQUHAR C.F., DICKINSON A.G.: Prolongation of scrapie incubation period

by an injection of dextrane sulphate 500 within the month before or after infection. *J. Gen. Virol., 67*: 463-473, 1986.

FARQUHAR J., GAJDUSEK D.C.: Kuru. Early letters and field-notes from the collection of D. Carleton Gajdusek, Raven Press, New York, 1981.

FONCIN J., GACHES J., CATHALA F., EL SHARIF E., LE BEAU J.: Transmission iatrogene interhumaine possible de maladie de Creutzfeldt-Jakob avec atteinte des grains du cervelet. *Rev. Neurol.* (Paris), *136*: 280, 1980.

FOSTER J.D., DICKINSON A.G.: Genetic control of scrapie in Cheviot and Suffolk sheep. *Vet. Rec., 123*: 159, 1988.

FRADKIN J.E., SCHONBERGER L., MILLS J.L., GUNN W.J., PIPER J.M., WYSOWSKI D.K., THOMSON R., DURAKO S., BROWN P.: Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States. *JAMA*, 1990, in stampa.

FRASER H.: Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature, 295*: 149-150, 1982.

GAJDUSEK D.C., Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science, 197*: 943-960, 1977.

GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR., ASHER D.M., BROWN P., DIWAN A., HOFFMAN P., NEMO G., ROHWER R., WHITE L.: Precautions in medical care of, and in handling materials from, patients with transmissible virus demantia (Creutzfeldt-Jakob disease). *N. Engl. J. Med. 297*: 1523-1258, 1977.

GAJDUSEK D.C., ZIGAS V.: Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N. Engl. J. Med., 257*: 974-978, 1957.

GIBBS C.J. JR., AMYX H.L., BACOTE A., MASTERS C.L., GAJDUSEK D.C.: Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *J. Infect. Dis., 142*: 205-208, 1980.

GIRARD J.: Notice sur quelques maladies peu connues des betes a laine. *Rec. Med. Vet., 7*: 26-39, 1930.

GOLDBERG H., ALTER M., KAHANA E.; The Libyan Jewish focus of Creutzfeldt-Jakob disease: a search for the mode of natural tansmission. In: Slow transmissible diseases of che nervous system, Prusiner S.B., Hadlow W.J., (eds.), Academic Press, New York, 1979, vol 1, pp. 195-211.

GOLDGABER D., GOLDFARB L.G., BROWN P., ASHER D.M., BROWN W.T., LIN S., TEENER J.W., FEINSTONE S.M., RUBENSTEIN R., KASCSAK R.J., BOELLAARD J.W., GAJDUSEK D.C.; Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker's syndrome. *Exp. Neurol., 106*: 204-206, 1989.

GORDON WS.: Advances in veterinary research. Louping-ill, tick-borne fever and scrapie. *Vet. Rec., 58*: 516-520, 1946.

HADLOW W.J., EHLUND C.M., KENNEDY R.C., JACKSON T.A., WHITFORD H.W., BOYLES C.C.: Course of experimental scrapie virus infection in the goat. *J. infect. Dis., 129*: 559-567, 1974.

HADLOW W.J., KARSTAD L.: Transmissible encephalopathy of mink in Ontario. *Can. Vet. J., 9*: 193-196, 1968.

HADLOW W.J., KENNEDY R.C., RACE R.E.: Natural infection of suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis., 146*: 657-664, 1982.

HARTSOUGH G.R., BURGER D.: Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J. Infect. Dis., 115*: 387-392, 1965.

HARTUNG J., ZIMMERMAN H., JOHANNSEN U.: Infectiose Enzephalopathie beim Nerz. I. Mitteiling: klinisch-epizootiologische und experimentelle untersuchungen. *Monatsheffe Vet. Med., 25*: 385-388, 1970.

HOLT T.A., PHILLIPS J.: Bovine spongiform encephalopathy. *Br. Med. J., 296*: 1581-1582, 1988.

HOPE J., HUNTER N.: Scrapie-associated fibrils, PrP protein and the Sinc gene. In: Novel infectious agents and the central nervous system, Ciba Foundation Symposium 135, John Wiley & Sons, Chichester, 1988, pp. 146-163.

HOURRIGAN J., KLINGSPORN A., CLARK W.W., DE CAMP M.: Epidemiology of scrapie in the United States. In: Slow transmissible diseases of the nervous system, Prusiner S.B., Hadlow W.J., (eds.), Academic Press, New York, 1979, vol. 1, pp. 331-356.

HSIAO K., BAKER H.F., CROW T.J., POULTER N., OWEN F., TERWILLIGER J.D., WESTAWAY D., OTT J., PRUSINER S.B.: Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature, 338*: 342-345, 1989.

KIMBERLIN R.H., WALKER C.A.: Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J. Gen. Virol., 67*: 255-263, 1986a.

KIMBERLIN R.H., WALKER C.A.: Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextrane sulphate, and some other polyanions. *Antimicrob. Agents Chemother., 30*: 409-413, 1986.

KIMBERLIN R.H., WALKER C.A., MILLSON G.C., TAYLOR D.M., ROBERTSON P.A., TOMPLISON A.H., DICKINSON A.G.: Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat, 59*: 355-369, 1983.

KIRSCHBAUM W.R.: Jakob-Creutzfeldt disease. Elsevier Publishing Company, New York, 1968.

KLITZAMN R.L., ALPERS M.P., GAJDUSEK D.C.: The natural incubation period of kuru and the episodes of transmission in three clusters of patients. *Neuroepidemiology, 3*: 3-20, 1984.

KONDO K., KUROIWA Y.: A case control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries. *Ann. Neurol., 11*: 377-381, 1982.

LO RUSSO F., NERI G., FIGÀ-TALAMANCA L.: Creutzfeldt-Jakob disease and sheep brain a report from central and southern Italy. *Ital. J. Neurol. Sci., 3*: 171-174, 1980.

LUMLEY-JONES R., BENKER G., SALACINSKI P.R., LLOYD T.J., LOWRY P.J.: Lar-

ge scale preparation of highly purified pyrogen-free human growth hormone for clinical use. *J. Endocrinol., 82*: 77-86, 1979.

MAFF: The bovine spongiform encephalopathy (No. 2). Order 1988. Statutory Instruments No. 1039.

MAFF: Cattle offal ban implemented. 8 novembre 1989 in New Release 436/89.

MARSH R.F.: The subacute spongiform encephalopathies. In: Slow virus diseases of animals and man, Kimberlin R.H., (ed.) North-Holland Publishing Co, Amsterdam, 1976, pp. 359-380.

MARSH R.F.: Bovine spongiform encephalopathy in the United States, *JAVMA, 196*: 1677, 1990.

MASTERS C.L.: Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: studies on the natural mechanisms of transmission. In: Prions. Novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease, Prusiner S.B., Mc Kinley M.P., (eds.), Academic Press, San Diego, 1987, pp. 511-522.

MASTERS C.L., GAJDUSEK D.C., GIBBS C.J. JR.: Creutzfeldt-Jakob disease virus isolation from the Gerstmann-Sträussler syndrome, with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induces spongiform encephalopathies. *Brain, 104*: 559-588, 1981.

MASULLO C., POCCHIARI M., MACCHI F., ALEMA G., PIAZZA G., PANZERA M.A.: Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by dural cadaveric graft. *J. Neurosurg., 71*: 954-955, 1989.

MASULLO C., POCCHIARI M., NERI G., CASACCIA P., IAVARONE A., LADOGANA A., MACCHI G.: A retrospective study of Creutzfeldt-Jakob disease in Italy (1972-1986). *Europ. J. Epidemiol., 4*: 482-487, 1988.

MATTHEWS W.B.: Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales 1980 through 1984. In: Unconventional virus diseases of the central nervous system, Court L.A., Melleray, 1989, pp. 13-18.

MATTHEWS W.B., WILL R.F.: Creutzfeldt-Jakob disease in a lifelong vegetarian. *Lancet, ii*: 937, 1981.

MIZUTANI T., SHIRAKI H.: Clinicopathological aspects of Creutzfeldt-Jakob disease. Elsevier Science Publishers, Amsterdam e Nishimura, Niigata, 1985.

MORGAN K.L.: Bovine spongiform encephalopathy: time to take scrapie seriously. *Vet. Rec., 122*: 455-466, 1988.

NISBET T.J., MAC DONALDSON I., BISHARA S.N.: Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. *JAMA, 261*: 1118-1119, 1989.

PARRY H.B.: Scrapie disease in sheep. Oppenheimer D.R., (ed.), Academic Press, London, 1983.

PATTISON I.H., HOARE M.N., JEBBETT J.N., WATSON G.C.: Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet. Rec., 90*: 465-468, 1972.

POCCHIARI M.: Methods for inactivating experimentally induced scrapie in hamster tissues. *JAVMA, 196*: 1683-1684, 1990.

POCCHIARI M., CASACCIA P., IAVARONE A., LADOGANA A., MARIOTTI P., MASULLO C., SCHMITTINGER S., MACCHI G.: Le encefalopatie spongiose subacute. *Quaderni di Neuropatologia, 4*: 1-25, 1988a.

POCCHIARI M., MACCHI G., PEANO S., CONZ A.: Can potential hazard of Creutzfeldt-Jakob disease infectivity be reduced in the production of human growth hormone? Inactivation experiments with the 263K strain of scrapie. *Arch. Virol., 98*: 131-135, 1988b.

POCCHIARI M., MASULLO C.: Prudenza terminologica e rischi teorici. In: *Le Scienze Quaderni*, ROSSI G.B. (ed.), 1985, *vol. 22*, p. 57.

POCCHIARI M., PEANO S., CONZ A., ESHKOL A., MAILLARD F., BROWN P., GIBBS C.J. JR., XI Y.G., TENHAM-FISHER E., MACCHI G.: Combination ultrafiltration and 6 M urea treatment of human growth hormone effectively minimizes risk from potential CJD virus-contamination. *Hormone Research*, 1990, in stampa.

POCCHIARI M., SCHMITTINGER S., MASULLO C.: Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J. Gen. Virol, 68*: 219-223, 1987.

POCCHIARI M., CASACCIA P., LADOGANA A.: Amphotericin B: a novel class of antiscrapie drugs. *J. infect. Dis., 160*: 795-802 1989a.

POCCHIARI M., SCHMITTINGER S., LADOGANA A., MASULLO C.: Effects of amphotericin B in intracerebrally scrapie inoculated hamster. In: Unconventional virus diseases of the central nervous system, Court L.A., Dormont D., Brown P., Kingsbury D.T. (eds.), Abbaye de Melleray, 1989b, pp. 13-18.

PRUSINER S.B.: Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science, 216K*: 136-144, 1982.

PRUSINER S.B., COCHRAN S.P., ALPERS M.P.: Transmission of scrapie in hamsters. *J. Infect. Dis., 152*: 971-978, 1985.

SOUTHWOOD R.: Report of the working party on bovine spongiform encephalopathy. Department of Health Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF), UK, 1989.

THADANI V., PENAR P.L., PARTINGTON J., KALB R., JANSSEN R., SCHONBERGER L.B., RABKIN C.S., PRICHARD J.W.: Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J. Neurosurg., 69*: 766-769, 1988.

WILESMITH J.W.: Epidemiology and current status of bovine spongiform encephalopathy in the united Kingdom. *JAVMA, 196*: 1674-1675, 1990.

WILESMITH J.W., WELLS G.A.H., CRANWELL M.P., RYAN J.B.M.: Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec., 123*: 638-644, 1938.

WILL R.G., MATTHEWS W.B.: Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 45*: 235-238, 1982.

C.L. BOLIS[1], C.J. GIBBS[2]

# ENCEFALOPATIA SPONGIFORME BOVINA (BSE)

[1] Laboratorio di Biologia Generale, Facoltà Farmacia, Università di Milano
[2] NINDS/NIH, Bethesda, MD, U.S.A.

Wells e collaboratori nel 1987 pubblicarono un primo rapporto sulla encefalopatia spongiforme bovina indicando l'incidenza di una nuova malattia neurologica di bovini domestici comparsa nel sud dell'Inghilterra. Questi autori misero in evidenza la rassomiglianza di questa malattia con encefalopatie trasmissibili dovute a "virus non convenzionali" quali la *scrapie*.

Essi basarono in primo luogo l'evidenza di questa rassomiglianza sui segni clinici progressivi e su dati neuropatologici, quale la presenza di fibrille in preparazioni di cervello derivate da bovini infetti.

Più tardi Hope e collaboratori hanno esteso questi studi ed hanno confermato che le fibrille descritte da Wells erano proprio le SAF's (*scrapie associated fibrills*) e contenevano la proteina associato alla *scrapie* "PrP" (*Prion Protein*).

Questi articoli che descrivevano la comparsa di una malattia simile alla *scrapie* in specie bovina in Inghilterra ed identificata come un nuovo membro delle encefalopatie virali spongiforme subacute, descritte da Gibbs e Gajdusek, hanno subito determinato gravi preoccupazioni da parte delle Autorità di salute pubblica, veterinari, allevatori di bovini, produttori di latte e delle industrie farmaceutiche e cosmetiche.

Sebbene la comparsa di questa patologia sia tuttora confinata all'Inghilterra, la grande distribuzione di *scrapie* in pecore in tutto il mondo e l'uso di carcasse di animali infetti opportunamente trattate come sorgente di supplemento proteico nell'allevamento dei bovini, lascia prevedere una potenziale comparsa di questa malattia in altre parti del mondo.

In realtà uno studio ben mirato ha messo in evidenza che molto probabilmente la causa della malattia era proprio legata alla somministrazione ai ruminanti di proteine derivanti da pecore infette.

L'allevamento dei ruminanti con supplemento di proteine derivate da ruminanti è stato vietato dal 18 luglio 1988.

In realtà nell'aprile del 1988 il governo inglese ha designato un gruppo di studio indipendente per studiare se poteva esistere una qualunque complicazione per la salute umana, dovuta alla comparsa di questa nuova malattia: il gruppo era diretto da Sir Richard Southwood. Il rapporto di Southwood fece una raccomandazione *ad interim*, messa in atto dall'8 agosto 1988, che tutti i bovini sospettati di essere portatori di BSE dovessero essere abbattuti e le loro carcasse distrutte.

Una ulteriore raccomandazione *ad interim* portò alla nomina di un Comitato di ricerca diretto dal Mr. D. Tyrrel per indicare le ricerche necessarie in rapporto alla BSE rispetto ad altre encefalopatie spongiformi.

Il gruppo di lavoro di Southwood pubblicò un rapporto il 27 febbraio 1989 concludendo che il rischio di trasmissione della BSE dai bovini all'uomo appariva essere estremamente remoto e che i bovini dovevano essere considerati come punto finale dell'infezione. Tuttavia il gruppo di studio riconobbe che se le loro previsioni fossero state incorrette, le implicazioni sarebbero state estremamente severe.

Quale misura di prudenza il governo inglese impose una totale proibizione all'uso, per l'alimentazione umana, del cervello, del midolo spinale, del timo, milza, intestino e tonsille di tutti i bovini.

Va anche notato che sia il rapporto di Southwood che quello di Tyrrel rappresentavano dei rapporti interni in Inghilterra mentre la comunità mondiale non era informata della serietà del problema.

I *mass media* inglesi andavano causando preoccupazione e anche panico tra la popolazione che leggeva informazioni superficiali date in modo non scientifico.

Il 27 e 28 giugno 1989 una tavola rotonda internazionale sul problema BSE fu organizzata dal *National Institute of Health*, Bethesda, Maryland in collaborazione con *l'Association Internatio-*

*nale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences,* Ginevra, Svizzera.

Vi parteciparono esperti delle encefalopatie spongiformi dall'Inghilterra, Stati Uniti, RDF, Francia e Italia.

Il rapporto con le raccomandazioni derivate da questo incontro internazionale fu pubblicato interamente in una sezione speciale del *Journal of American Veterinary Association* (JAVMA vol. 196, No. 10, 15 maggio 1990). Questo rapporto, oltre a considerare specifici problemi quali la possibile relazione tra la *scrapie* e le encefalopatie spongiforme umane (*kuru, Creutzfeld-Jacob disease,* la sindrome di *Gerstmann-Sträussler-Shinker*) e le encefalopatie spongiformi degli animali (encefalopatie del visone, del cervo e dell'alce in cattività), ha analizzato il rapporto Southwood ed il problema in generale. Gli esperti hanno sottolineato i criteri ben precisi per la sicurezza dei metodi di preparazione di prodotti da organi bovini (per esempio sterilizzazione, inattivazione, determinazione dei prodotti) e la adeguatezza dei *markers* di laboratorio per l'evidenziamento di agenti *scrapie* simili.

In conclusione, i partecipanti hanno formulato una serie di raccomandazioni utili per la diagnosi, inattivazione e controllo della malattia.

Nel marzo 1990 una seconda tavola rotonda è stata organizzata da Airen, del *National Institute of Neurological Disease and Stroke* presso il *Central Veterinary Laboratory, Weybridge,* Surrey, Inghilterra.

I partecipanti americani si sono incontrati con rappresentanti della Comunità Europea; le relazioni presentate riguardavano specialmente la biologia, biochimica, biologia molecolare, virologia ed epidemiologia della BSE riportando dati di studi in corso, mentre piani di studi futuri furono ampiamente discussi.

Fu anche sottolineato il fatto che al 2 febbraio 1990 il numero totale di casi confermati di BSE era di 9838, reperiti in 5659 fattorie.

Nuovi casi sono in corso di conferma al tasso di 550 casi al mese.

Fino ad oggi non vi è evidenza di trasmissione bovino-bovino o di trasmissione verticale. Si prevede una diminuzione di nuovi casi nella seconda metà del 1990.

Una delle prospettive particolarmente significative emerse dalla tavola rotonda è stata la possibilità che il materiale infetto contenuto nel supplemento proteico derivato da carcasse di ovini infetti da *scrapie* potesse essere di poca entità. A questo punto si è pensato che il materiale infetto potesse contenere enzimi od altre sostanze come per esempio l'istamina, capaci di alterare la permeabilità cellulare, rendendo così più suscettibile l'animale all'infezione da parte di proteine associate alla *scrapie* (PrP) e quindi facilitare l'infezione attiva. Questa possibilità è ora studiata a livello sperimentale, considerando oltre all'istamina, altre sostanze capaci di alterare la permeabilità cellulare.

## BIBLIOGRAFIA


BOLIS, C.L., GIBBS C.J., (1990) Proceedings of an International Rountable on Bovine Spongiform Encephalopathy - Summary Report and Recommendations. *Journal American Veterinary Medical Association. Vol. 196*, No 10, pp. 1673-1890.

WESTAWAY, D., PRUSINER, S.B., (1990) Link between Scrapie and BSE, *Nature 346*: 113.

WELLS, G.A.H., SCOTT, A.C., JOHNSON, C.T., GUNNING, R.F., HANCOK, R.D., JEFFREY M., DAWSON, M., BRADLEY, R., (1987) A Novel progressive Spongiform Encephalopathy in Cattle. *Veterinary Record 121*: 419-420.

HOPE, J., REEKIE, L.J.D., HUNTER, M., BEYREUTHER, K., WHITE, H., SCOTT, A.C., STACK, M.J., DAWSON, M., WELLS, G.A.H., (1988) Fibrils from Brains of Cows with New Cattle Disease Countain Scrapie-Associated Protein. *Nature 334*: 6197: 390-392.

WILESMITH, J.W., WELLS, G.A.H., RYAN, J.B.M., (1988) Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiological Studies. *Veterinary Record 123:* 638-644.

SOUTHWOOD, R., EPSTEIN. M.A., MARTIN, W.B., WALTON J. (1989) Report of the Working Party on Bovine Spongiform Encephalopathy, Department of Health, Ministry of Agricolture Fisheries and Food, Leafletts Unit. P.O. Box 21, Stanmore, Middlesex, HA7 ZA1.

G. FIORE

# ENCEFALOPATIA SPONGIFORME DEL BOVINO (BSE): DECISIONI IN AMBITO CEE

Ministero della Sanità, Direzione Generale dei Servizi Veterinari - Div. III, Roma

Vorrei innanzitutto ringraziare il Prof. Poli che con estrema sensibilità ha accettato un intervento "fuori programma" dal Ministero della Sanità, qui da me rappresentato.

La mia presenza in questa sede è strettamente legata al tema in trattazione: le encefalopatie spongiformi ed, in particolare, la BSE. Sono di ritorno infatti da Bruxelles dove ieri, dopo 36 ore di seduta consecutiva, si è concluso un Consiglio dei Ministri Agricoltura straordinario della CEE che aveva all'ordine del giorno un unico punto: l'encefalopatia spongiforme del bovino.

Alla base della decisione della CEE di trattare questo tema a livello di Consiglio dei Ministri esisteva una duplice considerazione: da un lato, la preoccupazione dei consumatori, alimentata anche da informazioni di stampa che, in particolare all'estero, non sempre sono state correttamente riportate; dall'altro alcune modifiche nella conoscenza della BSE, in particolare relative alla via di trasmissione seguita, che ha causato l'adozione di un bando all'importazione di bovini vivi e prodotti della specie bovina provenienti da Regno Unito deciso da Francia, RFT e, con qualche ora di differenza, anche dall'Italia.

Ma una precisazione mi preme sia fatta, prima di analizzare quanto deciso a Bruxelles: l'Italia è uno dei pochi Paesi membri, se non l'unico, a curare con realismo, che ad alcuni potrebbe sembrare eccessivo, la salute dei propri consumatori. Tale impostazione, che traspare storicamente dai provvedimenti assunti in particolare dalla Direzione dei Servizi Veterinari, ha alla sua base sia una matrice di "cultura veterinaria", sia una considerazione obiettiva: l'Italia è un Paese "trasformatore" di materie prime e pertanto legato alla

importazione, spesso massiccia delle stesse. Da ciò l'innalzamento della soglia/rischio di importanti materie prime non rispondenti a caratteristiche e parametri idonei da un punto di vista igienico/sanitario. E tale politica di controlli e provvedimenti ci ha portato spesso a rischiare la condanna alla Corte di Giustizia della CEE: anche qui, anche in questo episodio della BSE, si è cercata la coerenza.

Vorrei rapidamente ricordare infatti che siamo stati tra i primi Paesi membri a vietare l'importazione di mangimi, ottenuti con carni di ruminanti per l'alimentazione dei ruminanti, in provenienza da Regno Unito ed Irlanda, in linea con i pareri espressi dai ricercatori inglesi che la BSE si trasmettesse seguendo la via alimentare. Ed anche nell'atto di recepimento della Decisione CEE sulla BSE si è avuto cura di integrare quanto disposto a livello comunitario con misure aggiuntive che rendessero tali provvedimenti il più efficace possibile.

Allo stato attuale, a parte i provvedimenti nazionali esistenti, le disposizioni emanate dalla Commissione CEE sino ad ora sono state quattro:

1. Blocco dell'esportazione dal Regno Unito di bovini vivi nati anteriormente al 18.7.1988 (data in cui è enetrato in vigore nel Regno Unito il bando di produzione, commercializzazione e distribuzione di mangimi ottenuti da ruminanti e destinati all'alimentazione di ruminanti);

2. Introduzione della BSE nella lista di malattie a denuncia obbligatoria;

3. Blocco di esportazione di animali superiori ai 6 mesi e, per i vitelli inferiori ai 6 mesi importati dal Regno Unito, abbattimento obbligatorio entro il sesto mese di età (a tale divieto non sono però assoggettati i bovini, anche adulti, importanti in Regno Unito dopo il 18.7.88);

4. Blocco di esportazione di alcune categorie di organi e ghiandole, siano essi o meno destinate all'alimentazione umana, e comprensive, dunque anche degli organi e ghiandole per la produzione di farmaci.

Alcuni fatti nuovi però hanno creato scompiglio e preoccupazione, sia nel mondo della ricerca che nel consumatore comunitario: ci sono

sospetti che due gatti, nel Regno Unito (uno a Belfast ed uno a Bristol), abbiamo assunto l'agente della BSE e ci sono anche sospetti di BSE, sempre in Regno Unito,a carico di un vitello nato da una vacca di 15 mesi (sicuramente, quindi, non alimentata con i mangimi incriminati).

Per tali constatazioni, il Consiglio dei Ministri Agricoltura CEE ha voluto acquisire il parere del Comitato Scientifico Veterinario CEE e, nonostante la Commissione CEE non reputasse necessaria nessuna modifica alle Decisioni già adottate, dopo lunghe discussioni e tentativi di accordo, si è giunti alla emanazione di un parere del Consiglio dei Ministri (parere che dovrà nei prossimi giorni essere trasformato in Decisione della Commissione) indicante i principi da seguire nell'aggiornamento dei provvedimenti comunitari per le importazioni da Regno Unito:

1. Le carni, sino ad ora non interessate dalle disposizione della CEE, possono essere esportate dal Regno Unito solo se:

a) disossate, e nervate e prive di linfonodi;

b) nel caso in cui provengono da allevamenti indenni da due anni da BSE, possono essere esportate anche con osso;

2. Il Regno Unito dovrà attuare un accurato sistema di sorveglianza, da eseguirsi a livello di allevamenti e di stabilimenti di macellazione, per la BSE;

3. La Commissione dovrà avviare un'indagine da eseguirsi su tutto il territorio comunitario per indagare sulle modalità di fabbricazione dei mangini;

4. Dovrà essere avviato un programma di ricerca comunitario per affrontare gli aspetti ancora irrisolti di tale malattia.

Bisogna sottolineare che, almeno in parte, il Consiglio dei Ministri, ha tenuto in considerazione, nella stesura del suo parere, le proposte italiane presentate ufficialmente nella stessa sede e che avevano ricevuto la preventiva approvazione del Consiglio Superiore di Sanità.

Concludendo si può affermare che l'atteggiamento e le decisioni assunte a Bruxelles hanno raggiunto lo scopo di vedere aggiornati i provvedimenti di difesa del consumatore a quelli che sono gli attuali progressi della ricerca scientifica.

Voglio inoltre cogliere l'occasione per chiedere ufficialmente al

prof. Poli ed ai rappresentanti del mondo della ricerca qui convenuti di collaborare con il Ministero della Sanità nella creazione di un gruppo di ricerca nazionale sulla BSE che farà parte, in un secondo momento, del gruppo di ricerca comunitario, della cui formazione è stata incaricata ufficialmente la Commissione del Consiglio dei Ministri Agricoltura.

È un ulteriore sforzo che l'Italia fa per l'approfondimento di una patologia in parte ancora sconosciuta, nella prospettiva, che a mio parere deve essere sempre ben focalizzata davanti a noi, della difesa del consumatore, italiano e comunitario.

Finito di stampare
da La Nuova Cartografica S.p.A. - Brescia
nel Febbraio 1991