

Metodologie e tecniche nello studio delle encefalopatie spongiformi trasmissibili umane

F. Cardone, M. Pocchiari

Laboratorio di Virologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le encefalopatie spongiformi trasmissibili (EST) colpiscono l'uomo ed altri animali (tabella 1) e sono causate da agenti trasmissibili che determinano una patologia neurologica progressiva e rapidamente fatale preceduta da un periodo di incubazione che può durare da alcuni mesi a diversi anni. Questi agenti infettivi, conosciuti come prioni o virus lenti non convenzionali, presentano caratteristiche uniche nel mondo dei microrganismi: sono apparentemente privi di acidi nucleici, molto resistenti al calore e alla maggior parte dei comuni disinfettanti e non stimolano alcuna risposta immunitaria. Sebbene l'agente infettivo sia diffuso in tutto il corpo con concentrazioni particolarmente elevate nei principali organi linforeticolari (milza, tonsille e linfonodi), le lesioni istologiche sono confinate al sistema nervoso centrale (SNC) e comprendono spongiosi del neuropilo, perdita neuronale, astrocitosi e, a volte, presenza di placche amiloidee.

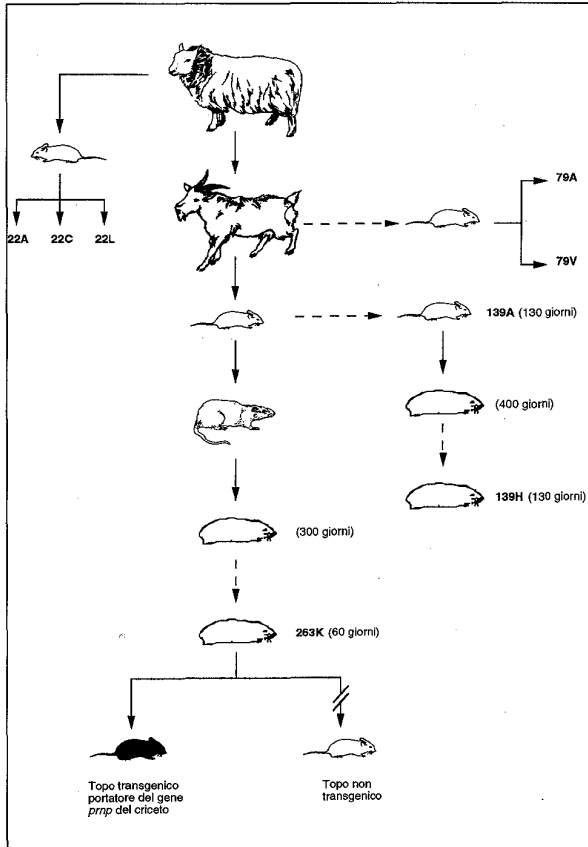
L'evento patogenetico caratteristico delle EST è costituito dall'alterazione di una glicoproteina cellulare di membrana, chiamata PrPc. La PrPc è una proteina di 253-257 aminoacidi (a seconda della specie considerata), con un peso molecolare apparente di 33-35 kDa e una struttura secondaria ricca di α -eliche. Dopo la sintesi, subisce un processo di glicosilazione, la formazione di un ponte disolfuro, la rimozione proteolitica di un peptide segnale dall'estremità N-terminale e la sostituzione di 23 residui C-terminali con un glicosil-fosfatidil-inositolo per l'ancoraggio alla membrana citoplasmatica.

Nei soggetti affetti da EST la PrPc, assume una conformazione patologica a foglietti- β e polimerizza

Tabella 1. Encefalopatie spongiformi dell'uomo e degli animali

Ospite naturale	Malattia
Uomo	Malattia di Creutzfeldt-Jakob Sindrome di Gerstmann-Sträussler Scheinker Insomnia Familiare Fatale
Pecora Capra Muffone	Scrapie
Cervo Alce	Malattia cronica devastante
Ospite accidentale	Malattia
Uomo	kuru Malattia di Creutzfeldt-Jakob Nuova variante MCJ
Pecora	Scrapie
Capra	Scrapie
Visone d'allevamento	Encefalopatia trasmissibile del visone
Bovino domestico	Encefalopatia spongiforme del bovino
Kudu maggiore Antilope alcina Gazzella orice Orice arabo Orice unicolorno Nyala	Encefalopatia spongiforme dei bovidi
Gatto domestico Puma Ghepardo Tigre	Encefalopatia spongiforme dei felini
Primati	Encefalopatia spongiforme dei primati

Figura 1. Isolamento di alcuni ceppi di scrapie dalla pecora. Alcuni ceppi (22A, 22C, 22L) sono stati isolati direttamente nel topo, altri dopo un passaggio intermedio nella capra (79A, 79V, 139A) o nella capra, topo e ratto (263K). La figura mostra anche l'effetto della "barriera di specie" tra il topo ed il criceto (139H) e tra il ratto ed il criceto (263K) che è caratterizzato da un tempo di incubazione (in parentesi) particolarmente lungo. Le linee tratteggiate indicano svariati passaggi nell'ospite prima che il tempo di incubazione si sia stabilizzato.



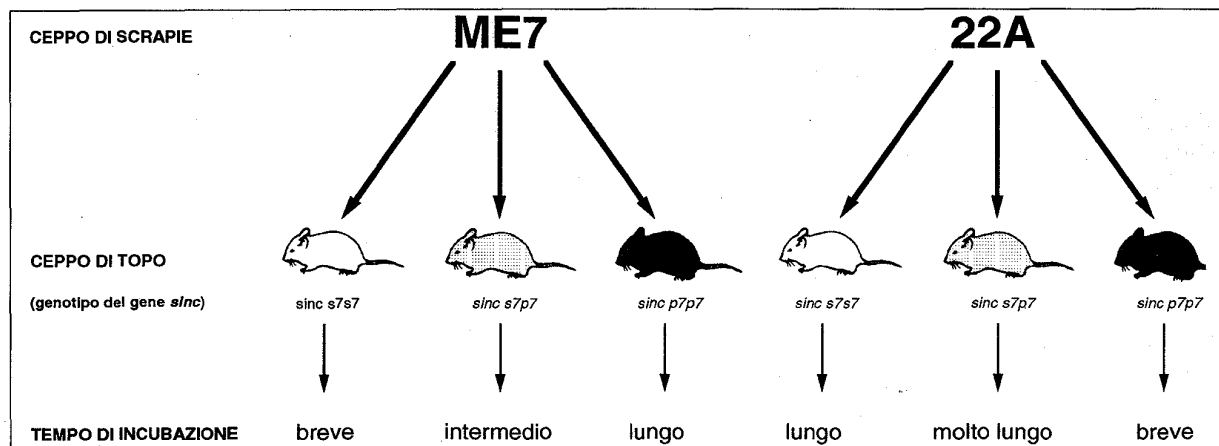
dall'esterno (trasmissione) perché abbia inizio il processo di trasformazione e di accumulo dell'amiloide. Dati recenti indicano che questo processo non può avvenire in assenza di cofattori specifici la cui natura è attualmente oggetto di studio. L'ipotesi del prione è avvalorata da numerosi dati sperimentali, il più importante dei quali è la copurificazione dell'infettività con la PrP^{Sc}. Tuttavia questa ipotesi non spiega come sia possibile avere diversi ceppi di scrapie (fig. 1) in assenza di un acido nucleico all'interno del prione.

La terza ipotesi sintetizza in un certo senso le due teorie precedenti e prevede che l'agente eziologico, chiamato virino, abbia un proprio acido nucleico non codificante protetto dalla PrP^{Sc}. Questa teoria potrebbe spiegare la presenza di vari ceppi di scrapie e l'assenza di risposta immunitaria dell'ospite.

Sebbene l'agente trasmissibile non sia stato ancora identificato con certezza, la sua esistenza è stata postulata sin dal secolo scorso. Nel 1830 uno studioso francese, J. Girard, riportò che la 'neuralgie lombaire', così era chiamato lo scrapie in Francia, si trasmetteva o per "contagio" o per via "ereditaria". Queste due diverse teorie, postulate più di 150 anni fa, erano il frutto di una attenta osservazione epidemiologica che risulta essere corretta ancora oggi sia per lo scrapie che per le encefalopatie spongiformi umane. I primi tentativi di trasmettere lo scrapie ai topi risalgono al 1899, ma i roditori vennero sacrificati troppo presto per poter permettere all'agente dello scrapie di replicarsi nel nuovo ospite e bisogna aspettare il 1936 per la trasmissione dello scrapie da pecora a pecora, e il 1961 per la trasmissione da pecora a topo. Negli anni '60 anche il kuru e la MCJ vennero trasmesse ad animali di laboratorio (tabella 3).

Tra i fattori che controllano la suscettibilità alla malattia, un ruolo primario è svolto dal gene *sinc* (da

Figura 2. Fattori che regolano il tempo di incubazione dello scrapie sperimentale nel topo. Notare come questi dipendano sia dal genotipo dell'ospite che dall'agente dello scrapie.



'scrapie incubation') individuato per la prima volta nel topo. Il gene ha due alleli, *s7* e *p7*. I topi omozigoti per *s7* hanno un tempo di incubazione breve (short) quando sono inoculati con la maggior parte dei ceppi di scrapie (ad esempio il ceppo ME7 da cui la dizione *s7*). I topi omozigoti per *p7* hanno un tempo di incubazione prolungato. Gli ibridi *s7p7* presentano un tempo di incubazione intermedio. Alcuni ceppi di scrapie (per esempio 22A e 87V), tuttavia, hanno un lungo tempo di incubazione in *s7* e breve in *p7*, dimostrando che il tempo di incubazione della malattia è un evento complesso che dipende sia dal genoma dell'ospite che dalle caratteristiche dell'agente infettante (fig. 2). La maggior parte dei topi disponibili sul mercato è omozigote in *s7*. L'unica razza di topi omozigoti per *p7* che è possibile ottenere commercialmente è quella dei I/Ln.

Nella pecora (il gene è chiamato *sip* ed i due alleli *sA* e *pA*) si verifica una situazione simile a quella descritta nel topo: le pecore omozigoti per *pA* hanno un tempo di incubazione molto lungo e, a volte, sopravvivono all'infezione sperimentale; inoltre sono normalmente refrattarie alla malattia naturale. Al contrario, le pecore eterozigoti ed omozigoti per *sA* sviluppano la malattia dopo l'infezione sperimentale e sono quelle colpite durante le epidemie naturali di scrapie. Recentemente, è stato dimostrato che il gene *sinc* del topo e quello *sip* della pecora equivalgono al gene della PrP. I due alleli *s7* e *p7* differiscono in posizione 108 e 189 mentre gli alleli *sA* e *pA* in posizione 136, 154 e 171.

Il gene della PrP è anche il maggiore determinante del fenomeno conosciuto come "barriera di specie", che consiste in un allungamento significativo del tempo di incubazione quando si cerca di trasmettere la malattia ad un ospite di specie diversa (per esempio passaggio primario dal topo al criceto, vedi fig. 1). A volte la barriera di specie può essere così marcata che il tempo di incubazione risulta perfino più lungo della durata della vita dell'ospite. La conferma dell'importanza del gene della PrP nel regolare la suscettibilità dell'ospite ad un determinato ceppo di scrapie è stata ottenuta con topi transgenici nei quali sono state inserite copie multiple del gene del criceto: i topi normali sono resistenti all'infezione con il ceppo 263K dello scrapie, mentre quelli transgenici contraggono lo scrapie 263K con un tempo di incubazione simile al criceto (fig. 1). Tuttavia l'introduzione del gene della PrP di una determinata specie non è sempre sufficiente a rendere l'ospite più suscettibile a ceppi infettanti adattati ad altre specie. Questo suggerisce che altri fattori intervengono nella determinazione della barriera di specie.

Informazioni indirette sulla barriera di specie derivano dallo studio dei casi di trasmissione accidentale (tabella 4). L'identificazione di questi episodi è fondamentale in quanto dimostra che, nonostante le dif-

ferenze di struttura primaria tra le PrPc, la barriera di specie tra gli animali coinvolti può essere superata. Tuttavia, data la natura occasionale del fenomeno, è estremamente difficile riuscire ad avere le informazioni necessarie per quantificare la barriera di specie. Nell'uomo le alterazioni del gene *PRNP* (sia mutazioni puntiformi che inserzioni) sono associate alla MCJ familiare, alla GSS ed alla FFI (tabella 2). Alcune di queste mutazioni hanno una penetranza completa (P102L, D178N) e pertanto i soggetti portatori presentano rischio elevato di sviluppare la malattia nel corso della loro vita; altre hanno una penetranza incompleta. Il gene *PRNP* presenta pure dei polimorfismi (tabella 5) che, a volte, non determinano alcuna modificazione dell'aminoacido corrispondente ma che, in due casi, sono responsabili di una sostituzione aminoacidica. Il polimorfismo più studiato è quello al codone 129. Nei casi di MCJ sporadica si osserva una frequenza maggiore di omozigosi rispetto alla popolazione normale. Inoltre si è visto che nei pazienti portatori di alcune mutazioni (ad esempio la 210), l'omozigosi al codone 129 è associata ad una età di insorgenza della malattia inferiore rispetto agli eterozigoti. Nell'ambito dei casi dovuti a trasmissione iatrogena (tabella 4) è stata osservata una maggior frequenza di omozigosi al codone 129 nei soggetti infettati con ormone della crescita cadaverico contaminato con l'agente della MCJ. Gli omozigoti inoltre, si sono ammalati con un tempo di incubazione medio inferiore agli eterozigoti.

I casi di nvMCJ registrati finora in Gran Bretagna ed in Francia sono tutti omozigoti per la metionina 129. L'omozigosi per metionina in questo caso potrebbe produrre la malattia con un tempo di incubazione inferiore rispetto agli eterozigoti ed agli omozigoti per valina. In alternativa potrebbe aumentare la suscettibilità alla malattia rispetto agli altri genotipi. Purtroppo i dati a disposizione non permettono ancora di stabilire se i casi di nvMCJ siano i primi di una vasta epidemia, oppure se siano il frutto di un episodio di contagio molto ristretto. I parametri fondamentali per realizzare una previsione epidemiologica affidabile (vale a dire la barriera di specie, la via di infezione, la minima dose infettante ed il tempo di incubazione) non possono essere determinati con le attuali conoscenze; di conseguenza, i modelli proposti finora forniscono degli scenari che presentano un grosso margine di incertezza.

La diagnosi delle encefalopatie spongiformi trasmissibili umane

Esistono tre livelli di accuratezza diagnostica per la MCJ sporadica. Due di questi (possibile e probabile, tabella 6, punti 1B e 1C) sono basati su dati clinici,

Tabella 6. Criteri diagnostici per la malattia di Creutzfeldt-Jakob

<p>1. MCJ SPORADICA</p> <p><i>A. Definitiva</i></p> <p>Ogni caso in cui la diagnosi clinica sia stata confermata da una delle seguenti indagini di laboratorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - trasmissione ad animali di laboratorio (primati o roditori) - presenza di lesioni tipiche all'esame neuropatologico - purificazione e identificazione mediante western blot della proteina amiloidea PrP^{sc}. <p><i>B. Probabile</i></p> <p>Ogni caso di Demenza con tracciato EEG tipico per MCJ e/o liquor 14-3-3 positivo a cui si associno almeno 2 tra i seguenti segni neurologici:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Mioclono - Segni visivi o cerebellari - Segni piramidali/extrapiramidali - Mutismo acinetico <p><i>C. Possibile</i></p> <p>Ogni caso di Demenza in cui l'EEG non sia stato eseguito o il tracciato EEG non sia tipico per MCJ e il liquor sia 14-3-3 negativo o non disponibile a cui si associno almeno 3 tra i segni neurologici riportati in 1B.</p> <p>2. MCJ IATROGENA</p> <p>A. Sindrome cerebellare in paziente trattato con ormone della crescita di tipo estrattivo.</p> <p>B. Paziente classificato 1A/1B in cui risulti nell'anamnesi un rilevante fattore di rischio per la trasmissione accidentale della malattia.</p> <p>3. MCJ FAMILIARE</p> <p>A. Ogni caso di MCJ con diagnosi 1A/1B che abbia almeno un parente stretto affetto da MCJ con diagnosi 1A/1B</p> <p>B. Ogni caso di Demenza in cui vi sia una mutazione del gene <i>PRNP</i></p>

strumentali e di laboratorio. Per confermare definitivamente la diagnosi di MCJ e delle altre EST occorre eseguire una delle tre indagini di laboratorio riportate nella tabella 6, punto 1A. Le forme iatrogene sono riconosciute sulla base dei fattori di rischio identificati mediante l'indagine anamnestica. Le forme familiari possono essere identificate sia grazie all'anamnesi familiare che alla presenza di mutazioni del gene *PRNP* (tabella 6).

1. Trasmissione ad animali di laboratorio

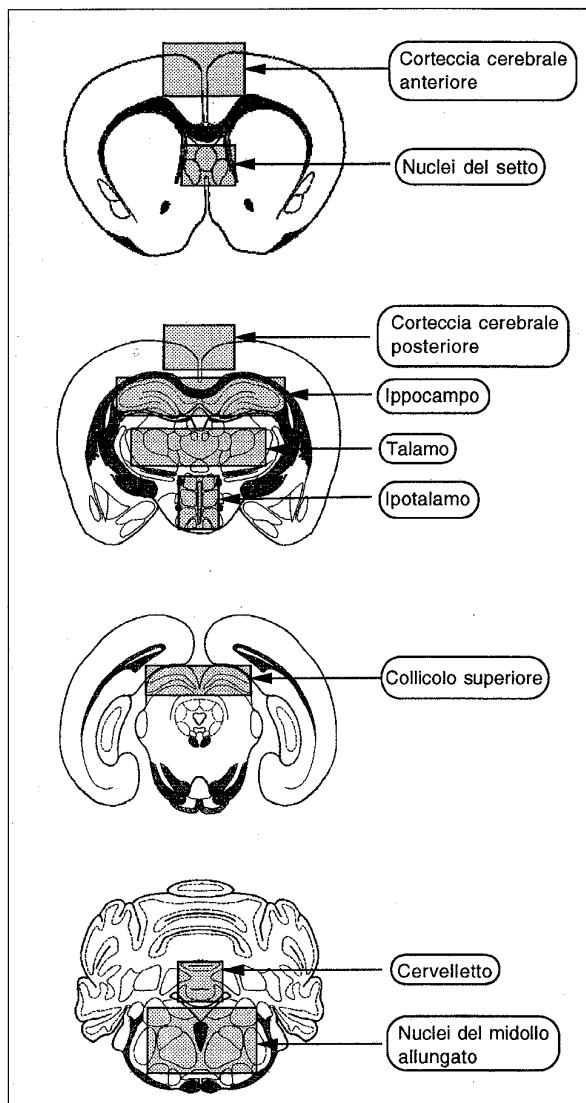
La trasmissione sperimentale della malattia in animali da laboratorio si ottiene attraverso l'inoculazio-

ne intracerebrale del campione da esaminare. Il tessuto viene omogenato mediante omogenizzatori meccanici (per es. Ultra-Turrax), in tampone fosfato a pH 7.4, ad una concentrazione del 10 per cento (peso:volume) e centrifugato a bassa velocità (15 minuti a 500 x g). Il sovratanante viene raccolto e conservato a -80°C fino al momento dell'inoculazione. Le procedure di omogenizzazione devono essere eseguite in cappe biologiche di tipo II a flusso laminare verticale e l'operatore deve indossare camice impermeabile a perdere e doppi guanti. Se non si è sicuri della sterilità del tessuto, è consigliabile aggiungere penicillina (100 unità/ml) e streptomina (0.1 mg/ml) all'omogenato. L'inoculazione intracerebrale nei roditori (topi, cavie, criceti) si effettua con una siringa monouso da 0.5 ml (in caso non fosse disponibile è possibile usare le comuni siringhe da insulina) munita di ago 26G da 3/8 di pollice. E' consigliabile usare animali appena svezzati per poter passare facilmente attraverso la calotta cranica con l'ago. La quantità di inoculo varia da 0.03 ml nei topi a 0.05 ml nei criceti e nelle cavie. La testa dell'animale viene immobilizzata tra l'indice ed il pollice dell'operatore e l'inoculazione viene eseguita nella regione temporo-parietale assicurandosi che la punta dell'ago sia penetrata per 3-5 mm nel tessuto cerebrale. L'inoculazione dell'omogenato tissutale deve essere eseguita lentamente ed è opportuno aspettare qualche secondo prima di estrarre l'ago per evitare la fuoriuscita dell'inoculo. Il tavolo su cui si esegue l'operazione deve essere ricoperto con fogli di plastica per evitare la contaminazione.

Se l'inoculazione intracerebrale viene eseguita correttamente, la mortalità è inferiore all'uno per cento ed è possibile iniettare 100 animali in meno di un'ora. Gli animali vengono alloggiati in gabbie apposite contenute in armadi stabulario di sicurezza con acqua e cibo *ad libitum* e controllati periodicamente (almeno 2 volte a settimana) per la valutazione dei segni clinici della malattia. Le manifestazioni cliniche variano a seconda della specie e del ceppo infettante inoculato. Nel criceto la prima manifestazione clinica è caratterizzata da un'ipersensibilità alle stimolazioni acustiche e da un comportamento aggressivo quando manipolato, a cui fa seguito un caratteristico tremore del capo ed una atassia della marcia che aggravandosi porta l'animale a frequenti cadute. Con il peggioramento della sintomatologia clinica l'animale giace inerte nella gabbia fino alla morte che in genere sopraggiunge dopo 2 settimane dalla comparsa dei primi segni clinici. Nel topo, le manifestazioni cliniche sono spesso precedute dall'arruffamento del pelo e dall'irrigidimento plastico della coda. La trasmissione primaria dall'uomo ai roditori mediante inoculazione intracerebrale richiede dei tempi molto lunghi che non sono mai inferiori ad 1 o

2 anni. Inoltre, poiché esiste un'alta barriera di specie tra uomo e roditori, questi ultimi sono poco ricettivi all'infezione con materiale umano, e solo nel 20% circa dei casi si riesce a trasmettere la malattia, di conseguenza l'assenza di trasmissione nel nuovo ospite non significa assenza di infezione del donatore, ma indica solo l'inefficienza della specie testata. Per aumentare la sensibilità dei roditori ai ceppi di EST umane sono stati realizzati topi knock-out in cui è stato inserito un gene *PRNP-prnp* chimerico uomo-topo. Questi animali sono estremamente suscettibili all'infezione con ceppi di EST umane e si ammalano con tempi inferiori ad un anno.

Figura 3. Sezioni di cervello di criceto dove sono evidenziate (quadrati grigi) le nove aree cerebrali che debbono essere valutate per costruire un corretto profilo delle lesioni istologiche nello scrapie.



La trasmissione sperimentale ai roditori di laboratorio ed in particolare ai topi è l'unico sistema attualmente disponibile per poter identificare i ceppi responsabili delle EST. Poiché non si conosce la natura dell'agente infettivo, i vari ceppi (soprattutto per quanto riguarda lo scrapie, ma anche per la MCJ) vengono distinti in base ad alcune caratteristiche della malattia indotta negli animali di laboratorio: il tempo di incubazione ed il profilo delle lesioni istologiche nel SNC (fig. 3). Una volta isolato, ogni ceppo di scrapie mantiene nei passaggi successivi nella stessa specie ospite il suo caratteristico tempo di incubazione e il profilo delle lesioni istologiche.

Il profilo delle lesioni si ottiene attribuendo un punteggio da 0 (niente spongiosi) a 5 (massima spongiosi) alla spongiosi (fig. 4) in nove diverse aree della sostanza grigia (midollo, corteccia cerebellare, mesencefalo, ipotalamo, talamo, ippocampo, setto, corteccia cerebrale posteriore e anteriore) ed in tre regioni della sostanza bianca (cervelletto, tegmento del mesencefalo e tratti piramidali). È stata questa la metodica che ha permesso di dimostrare al di là di ogni dubbio l'identità tra il ceppo della BSE e quello responsabile della nvMCJ.

L'inoculazione e la stabulazione di primati è più complessa ed è sottoposta a restrizioni di natura etica. I primati, per l'affinità evolutiva con l'uomo, rappresentano un eccellente modello sperimentale per lo studio della patogenesi delle EST umane. Per queste ragioni si tende ad adoperarli solo in esperimenti selezionati per poter studiare particolari ceppi infettanti (ad esempio quello della BSE) potenzialmente pericolosi per l'uomo.

L'inoculazione sperimentale di roditori di laboratorio è l'unico sistema disponibile per misurare la concentrazione di infettività di un dato materiale.

In base alla teoria del prione, purificare l'agente infettante equivale ad isolare la PrP^{sc} che è la sola o,

Figura 4. Lesioni spongiformi del cervello di criceto con scrapie sperimentale (ceppo 263K). Colorazione ematossilina-eosina.

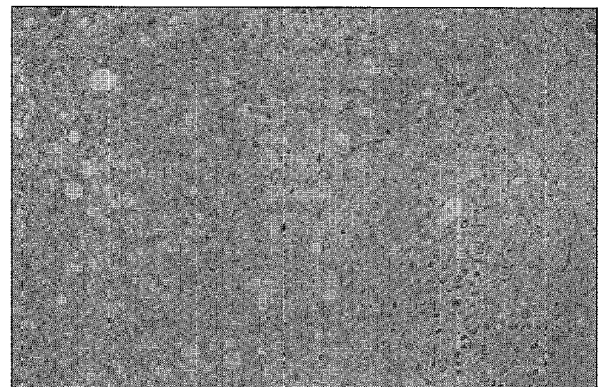
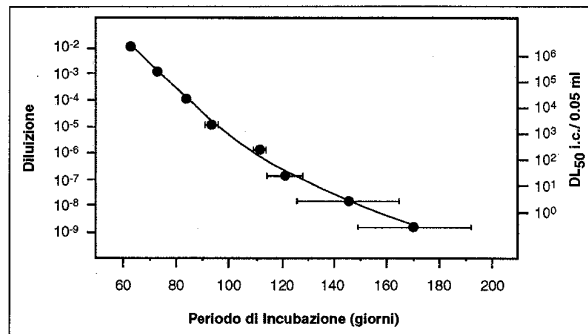


Figura 5. Curva dose risposta del ceppo 263K dello scrapie. Ogni diluizione di un omogenato di cervello di criceto (asse delle ordinate di sinistra) è stato inoculato in 12 criceti ed il relativo tempo di incubazione di ciascun animale che ha sviluppato la malattia (dalla diluizione 10^{-2} a 10^{-6} tutti e 12 gli animali hanno contratto lo scrapie) è stato riportato sull'asse delle ascisse. Sull'asse delle ordinate di destra è riportato il titolo di infettività presente nell'inoculo (0.05 ml) ad ogni diluizione. Le linee tratteggiate rappresentano le deviazioni standard della curva.



per lo meno, la componente più importante e significativa dell'agente eziologico. Per la teoria virale, purificare il virus (supposto ma non identificato) equivale a concentrare l'infettività rispetto alla quantità di proteine o di acido nucleico del campione di partenza. Sebbene la differenza concettuale sia notevole, in pratica l'infettività copurifica con la PrPsc e pertanto isolare la PrPsc equivale a concentrare l'infettività. La concentrazione di PrPsc nei vari organi non ha un rapporto costante con l'infettività, di conseguenza è possibile calcolare l'infettività a partire dalla PrPsc solo se si dispone di una curva cinetica che mostri il rapporto tra i due parametri durante l'infezione. E' pertanto preferibile misurare direttamente il livello di infettività in ogni preparato di cui si voglia conoscere la carica infettiva utilizzando il saggio biologico.

Vi sono due metodiche per titolare la quantità dell'agente infettante in un campione biologico. La prima è quella descritta da Reed e Muench nel 1938 e consiste nell'inoculare intracerebralmente in un gruppo di almeno 6 animali diluizioni seriali del campione da esaminare e quindi nel calcolare qual'è la diluizione che uccide il 50% degli animali. La seconda metodica è più semplice ma meno precisa e consiste nel misurare il tempo di incubazione medio della malattia in un gruppo di almeno 6 animali e quindi riportarlo ad una curva dose-risposta dove, ad ogni tempo di incubazione, corrisponde una precisa concentrazione di infettività. Esiste, infatti, una relazione tra la dose iniettata ed il tempo di incubazione della malattia che è data dalla seguente equazione:

$$Y = 10(a + bT) + 10(c + dT)$$

dove a, b, c, e d sono delle costanti, T è il tempo di incubazione ottenuto sperimentalmente per ogni diluizione e Y è la DL₅₀ per inoculo espressa in numeri naturali (fig. 5). Dalla figura, appare evidente che mentre per alte concentrazioni virali la deviazione standard della curva è entro limiti accettabili e quindi il valore ottenuto non si discosta molto da quello misurato con la tecnica delle diluizioni seriali, per basse concentrazioni ciò non è più valido data la grande variabilità del tempo di incubazione.

La sensibilità delle due tecniche dipende da due fattori: la quantità del tessuto inoculato ed il numero di animali usati. Il primo fattore è quello più limitante dato che non è possibile iniettare per via intracerebrale più di 5-10 mg di tessuto per animale. Infatti, la quantità di inoculo iniettabile per animale è 0,05 ml di un omogenato tissutale al 10, o al massimo al 20 per cento (peso:volume). Ne consegue che è possibile rilevare al massimo la presenza di 1 DL₅₀ per 5/10 mg che equivale a 200/100 DL₅₀ per grammo di tessuto. E' tuttavia possibile superare questo limite aumentando il numero di animali inoculati. Infatti, se su 10 animali inoculati con un omogenato tissutale al 10%, 5 presentano segni clinici e neuropatologici di malattia, l'inoculo avrà un titolo di 1 DL₅₀, ma se gli animali inoculati sono stati 100 e quelli che hanno mostrato la malattia sempre 5, il titolo dell'inoculo sarà di 0,1 DL₅₀. E' evidente, che per avere una sensibilità del test ancora maggiore, il numero degli animali da inoculare diventa così elevato da essere impraticabile.

La barriera di specie comporta inoltre una diminuzione significativa della sensibilità del saggio biologico quando si cerca di misurare l'infettività delle EST naturali in roditori di laboratorio: si è calcolato ad esempio che il topo è circa mille volte meno sensibile del bovino all'infezione sperimentale con l'agente della BSE. Questo comporta una sottostima sistematica dell'infettività. I topi transgenici portatori del gene della PrP bovina hanno tempi di incubazione inferiori rispetto a quelli osservati con topi RIII non transgenici (250 anziché 300 giorni). Il tempo di incubazione più breve però non sottintende automaticamente una maggiore sensibilità degli animali transgenici, né può essere utilizzato per calcolare il titolo infettante in assenza di curve dose risposta specifiche, costruite utilizzando questi animali.

L'agente infettivo delle encefalopatie spongiformi è distribuito nei diversi tessuti, organi, e fluidi corporei dell'organismo in concentrazioni a volte molto variabili. Le informazioni più complete sono quelle relative alla distribuzione dell'agente dello scrapie nei suoi ospiti naturali: la pecora e la capra. In seguito a questi studi, eseguiti agli inizi degli anni '80 dal veterinario americano William Hadlow, i vari tessuti sono stati suddivisi in cinque categorie a se-

Tabella 7. Livelli di infettività nei diversi organi e tessuti della pecora/capra con scrapie naturale durante la fase clinica e preclinica della malattia

TESSUTI	TITOLO (media \pm SEM di (n) campioni)	
	FASE CLINICA	FASE PRECLINICA
<i>Categoria I (Infettività molto alta)</i>		
Cervello	5.8 \pm 0.2 (69)	2.2 \pm 0.1 (12)
Midollo spinale	5.7 \pm 0.2 (15)	<2.0 (6)
<i>Categoria II (Infettività alta)</i>		
Ileo (placche di Peyer)	4.7 \pm 0.1 (12)	3.4 \pm 0.5 (9)
Linfonodi	4.4 \pm 0.1 (63)	2.9 \pm 0.2 (45)
Colon prossimale (placche di Peyer)	4.5 \pm 0.2 (12)	3.4 \pm 0.5 (9)
Milza	4.5 \pm 0.2 (12)	3.1 \pm 0.4 (3)
Tonsille	4.4 \pm 0.3 (12)	2.9 \pm 0.4 (3)
[Dura madre]	~5.0	
[Ghiandola pineale]	~5.0	
[Placenta]	~5.0	
<i>Categoria IIIa (Infettività media)</i>		
Surrene	3.2 \pm 0.3 (12)	<2.0 (1)
Colon distale	2.9 \pm 0.2 (12)	<2.0 (9)
Mucosa nasale	2.6 \pm 0.2 (12)	<2.0 (1)
Ipofisi	3.1 \pm 0.3 (12)	-
Nervo sciatico	3.2 \pm 0.2 (12)	-
<i>Categoria IIIb (Infettività minima)</i>		
Midollo osseo	<2.0 \pm 0.1 (12)	-
Liquido cefalorachidiano	<2.2 \pm 0.1 (12)	-
Fegato	<2.0 \pm 0.1 (9)	-
Polmone	<2.0 \pm 0.1 (11)	-
Pancreas	<2.1 \pm 0.1 (9)	-
Timo	<2.2 \pm 0.1 (12)	<2.0 (1)
<i>Categoria IV (Infettività non misurabile)</i>		
Sangue	<1.0 (12)	<1.0 (8)
Feci	<2.0 (3)	<2.0 (8)
Cuore	<2.0 (9)	-
Rene	<2.0 (12)	-
Ghiandole mammarie	<2.0 (10)	-
Latte	<1.0 (3)	-
Ovaio	<2.0 (10)	-
Saliva	<1.0 (9)	-
Ghiandole salivari	<2.0 (12)	<2.0 (2)
Vescicola seminale	<2.0 (1)	-
Siero	<1.0 (3)	<1.0 (8)
Muscolo scheletrico	<2.0 (10)	-
Testis	<2.0 (1)	-
Tiroide	<2.0 (9)	-
Utero	<2.0 (6)	-
[Bile]	<1.0	
[Cartilagine]	<2.0	
[Osso]	<2.0	
[Peli]	<2.0	
[Pelle]	<2.0	
[Tessuto connettivo]	<2.0	
[Urine]	<1.0	

* Il titolo di infettività è espresso in \log_{10} di DL₅₀/grammo di tessuto o ml di fluidi. I tessuti in parentesi quadra non sono stati testati nei lavori originali di Hadlow.
Dati da Hadlow e coll. 1980, 1982, modificati.

conda del loro grado di infettività. Come si osserva nella tabella 7, nella categoria I, (tessuti con infettività molto alta), sono stati riportati solo il cervello e il midollo spinale che rappresentano gli organi bersaglio delle EST e hanno un titolo di infettività di circa 100-1000 volte superiore ai tessuti della categoria II. Nella categoria I sono stati inclusi anche gli occhi, la cui elevata infettività è stata dimostrata da altri studi. Alla categoria dei tessuti ad alta infettività appartengono gli organi e tessuti del sistema linforeticolare, dove l'agente infettante si replica prima di giungere al SNC, senza però produrre alcuna lesione funzionale o istopatologica. La categoria III è stata divisa in due sottogruppi per distinguere i tessuti in cui l'infettività è di media entità, ma pur sempre riscontrabile, da quei tessuti in cui l'infettività, si osserva solo saltuariamente. Nella categoria IV sono classificati tutti i tessuti in cui l'infettività non è misurabile.

Questa classificazione riflette, sebbene con alcune variazioni, la distribuzione dell'infettività nei diversi organi e tessuti dell'uomo affetto da MCJ o da patologie simili. I dati disponibili sulla BSE sono ancora incompleti, ma indicano una distribuzione dell'infettività più ristretta rispetto allo scrapie.

2. Esame neuropatologico

L'encefalo non mostra alcuna specifica alterazione all'esame macroscopico, ad eccezione di una leggera atrofia corticale e talora una modesta riduzione del peso. Il tessuto cerebrale fissato in formalina tamponata al 10% o in Carnoy deve essere tagliato in blocchetti di spessore non superiore a 5 μ m che vengono decontaminati mediante immersione in acido formico per un'ora. Dopo immersione in liquido di fissaggio fresco per 48 ore il tessuto viene incluso in paraffina, tagliato in sezioni di 5 μ m di spessore e colorato con ematossilina/eosina secondo le procedure istologiche standard.

Fino al passaggio di decontaminazione in acido formico, il pezzo istologico è altamente infettivo e deve essere processato con strumentazione dedicata e materiale a perdere al di sotto di una cappa biologica di tipo II.

Le lesioni istologiche della MCJ sono di natura degenerativa, nonostante l'eziologia infettiva della malattia. L'alterazione spongiforme si caratterizza per la presenza di vacuoli di piccole dimensioni, raramente confluenti, non pericellulari e diffusi nel neuropilo a livello delle strutture grigie corticali e sottocorticali, nello strato molecolare del cervelletto e, nella forma "panencefalopatica" della malattia, nella sostanza bianca.

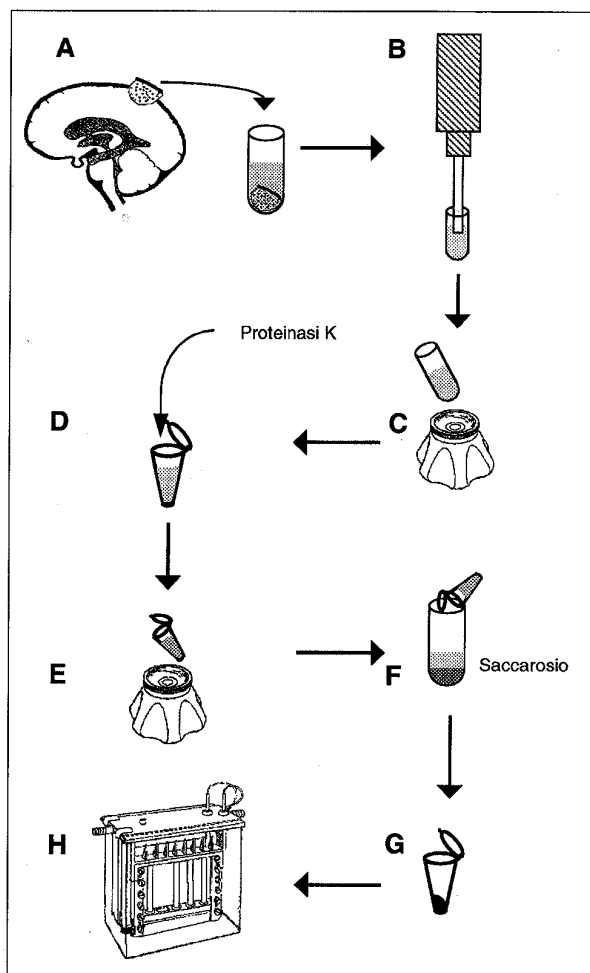
La perdita neuronale è molto variabile, ma in genere tende ad essere più severa nei casi di lunga durata. L'astrocitosi è invece un reperto più costante sia nel-

la corteccia cerebrale che nelle strutture sottocorticali, soprattutto nel talamo e nel cervelletto. E' caratterizzata da proliferazione ed ipertrofia degli elementi fibrosi e protoplasmatici che assumono talvolta la forma di gemistociti.

Nella MCJ i depositi di proteina PrPsc sotto forma di placche di amiloide si riscontrano solo nel 5-10% dei casi sporadici. Le placche sono localizzate essenzialmente a livello del cervelletto, ipotalamo, giro cingolato e nuclei della base.

Oltre alla valutazione istologica tradizionale è possibile anche lo studio immunocitochimico sulle sezioni cerebrali per evidenziare la distribuzione della PrPsc. Per migliorare la resa degli antisieri anti-PrP (Chemicon; Prionics) è consigliabile pretrattare le sezioni con acido formico per 5 minuti, poi con guanidinio tiocianato 4 M e quindi passarle in autoclave a 121°C prima di incubarle con gli antisieri specifici.

Figura 6. Schema dei passaggi fondamentali per la purificazione della PrP27-30 da cervelli infetti.



L'esame immunocitochimico con anticorpi anti-PrP rivela, oltre alla eventuale presenza di placche di amiloide, depositi granulari densi nel neuropilo associati a lesioni spongiformi e depositi puntiformi nel citoplasma o intorno al corpo cellulare di astrociti e neuroni nella sostanza grigia corticale e, più frequentemente, nel diencefalo e nel tronco cerebrale.

L'esame neuropatologico della nuova variante mostra, oltre alle caratteristiche sopra descritte, la presenza di numerose placche circondate da spongiosi (placche floride). Vi è inoltre un notevole accumulo di PrPsc all'esame immunocitochimico.

3. Purificazione ed identificazione della PrPsc mediante western blot

Venti grammi di tessuto cerebrale vengono prelevati da una area corticale (fig. 6A) ed omogeneizzati in 80 ml di una soluzione al 10% di sarcosyl usando un omogeneizzatore meccanico (Ultra-Turrax) regolato a media potenza (fig. 6B). Durante questa procedura è opportuno tenere il contenitore immerso in ghiaccio per evitare che l'omogenato si riscaldi. Per eliminare la schiuma che si forma durante l'omogeneizzazione si aggiunge qualche goccia di n-ottanolo. Si lascia l'omogenato per 30 minuti a temperatura ambiente per ottenere una migliore estrazione delle proteine di membrana, e quindi della PrPsc, da parte del detergente. Si centrifuga la sospensione cerebrale a 22000 x g per 30 minuti a 15°C per eliminare membrane, nuclei e frammenti cellulari. La PrPsc non è precipitata da questa procedura e si ritrova nel sovrinatante che viene raccolto in una beuta da 250 ml. Per migliorare la resa della procedura si riomogeneizza il precipitato in 100 ml di sarcosyl 10%, si centrifuga come prima, quindi si preleva il sovrinatante e lo si aggiunge al precedente. Si divide il sovrinatante così ottenuto in circa 10 tubi di policarbonato (circa 20 ml ciascuno) muniti di tappo a vite e chiusura a tenuta e si centrifuga a 215000 x g per 3 ore a 20°C. A questo stadio la PrPsc si trova nel precipitato, che ha un diametro di circa 1 cm con una zona centrale di colore marrone scuro circondata da un alone più chiaro, composto principalmente da lipoproteine. Per eliminare questa contaminazione, si risospende il precipitato con una soluzione di NaCl al 10%, 1% sarcosyl in tampone Tris-HCl, 10 mM a pH 7.4 (soluzione A). Per dissolvere il precipitato si usa un ultrasonicatore con sonda ad immersione (3-5 mm), regolato a bassa potenza ed azionato per circa 5 secondi, con 5 secondi di pausa, ripetendo la procedura fino alla completa disgregazione del precipitato. Questa procedura si esegue aggiungendo 5 ml della soluzione A ad uno dei 10 tubi con il precipitato, si versa poi la sospensione in un altro tubo, si sospende il precipitato del secondo tubo e si ripete la pro-

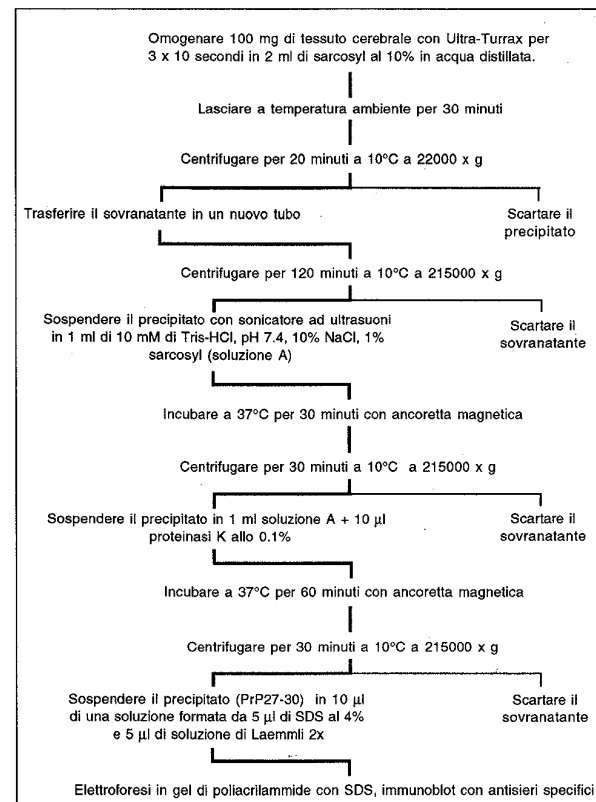
cedura per cinque volte. Si concentrano così tutti i precipitati in due soli tubi a cui si aggiungono altri 15 ml della soluzione A, quindi si risospende il tutto con il sonicatore. E' importante tenere il tubo in ghiaccio durante la sonicazione per evitare surriscaldamento. Si lasciano i campioni per tutta la notte a temperatura ambiente. Il giorno seguente, i campioni vengono trattati di nuovo con il sonicatore e poi centrifugati a 215000 x g per 4 ore a 20°C (fig. 6C). Il precipitato, piccolo e di colore molto scuro, viene risospeso con 1 ml per ciascun tubo di soluzione A con il sonicatore ad ultrasuoni, la sospensione viene trasferita in 2 microprovette da 1.5 ml, incubata a 37°C per 2 ore con un'ancoretta magnetica e precipitata per microcentrifugazione (14000 rpm per 20 minuti a 4°C). I precipitati delle due microprovette sono risospesi con 1 ml di soluzione A a cui si aggiungono 10 µl di proteinasi K allo 0.1% preparata subito prima dell'uso ed incubati a 37°C per 2 ore con agitatore magnetico (fig. 6D). Il trattamento proteolitico viene eseguito per rimuovere contaminazioni proteiche e soprattutto per digerire la PrPc normalmente presente nel tessuto cerebrale. Dopo il trattamento proteolitico i due campioni vengono precipitati in microcentrifuga (fig. 6E), sospesi in 1 ml di 0.1% sarcosyl contenente 0.2 mM di fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) e lasciati per tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente si incubano a 37°C per 1 ora con microagitatore magnetico e quindi si trasferiscono in un solo tubo da 15 ml a cui si aggiungono 8 ml di 0.1% sarcosyl. Si tratta la sospensione così ottenuta con ultrasonicatore e si versa in un altro tubo da centrifuga di policarbonato in cui erano stati precedentemente aggiunti due strati di 5 ml ciascuno di saccarosio (fig. 6F); lo strato inferiore è alla concentrazione del 20% in 0.1% di sarcosyl e quello superiore al 10% in sarcosyl. Si centrifuga a 215000 x g per 5 ore a 15°C ed il precipitato così ottenuto è la PrP27-30 purificata (fig. 6G). La quantità di PrP27-30 purificata con questa metodica è di circa 0.2 mg per 20 grammi di corteccia cerebrale il che equivale ad una purificazione di circa 10000 volte rispetto al campione di partenza. La purezza della PrPsc si controlla mediante elettroforesi (fig. 6H). E' consigliabile usare un sistema di mini-gel per non sprecare il materiale purificato. Si sospende la PrP27-30 in 0.2 ml di una soluzione di TBS con 0.1% di detergente SB 3-14, si preleva 1 µl e si aggiungono 10 µl della soluzione di Laemmli, si denatura per 5 minuti immergendo la provetta in acqua a 100°C e quindi si carica il campione in un pozzetto di mini-gel al 12.5% di poliaccrilammide con SDS. Si fa correre il gel per circa 1 ora a corrente costante di 30 mA a 15°C. Il gel viene colorato con nitrato d'argento e la PrP27-30 appare come una tripletta di

bande di circa 27-30, 23-25, 17-19 kDa, corrispondenti a tre isoforme che differiscono per il grado di glicosilazione.

La procedura descritta permette di ottenere la proteina con una purezza superiore al 90% adatta per molti studi di tipo biochimico e biofisico (sequenziamento, analisi aminoacidi, spettrometria di massa, dicroismo circolare).

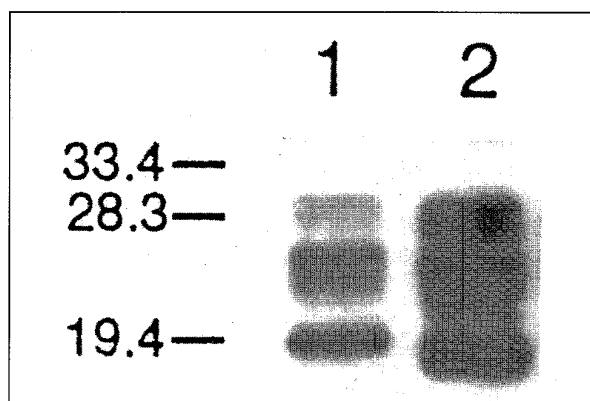
Nello schema rappresentato in figura 7 è riportato un metodo semplificato per purificare la PrP27-30 da piccole quantità di tessuto cerebrale che può essere usato convenientemente per la conferma diagnostica. A questo scopo, dopo l'elettroforesi, si deve trasferire la PrP27-30 su membrana di nitrocellulosa mediante western blotting; quindi si incuba la membrana con antisiero anti-PrP, poi con anticorpi secondari coniugati con perossidasi o con fosfatasi alcalina, e infine si colorano le bande con i substrati cromogeni adatti. All'immunoblot compaiono le 3 bande principali di 27-30, 23-25, 17-19 kDa e alcune bande accessorie che rappresentano dimeri (60 kDa) o forme troncate della PrP. Recentemente si è visto che sulla base del peso molecolare e dell'intensità relativa delle tre bande della proteina è pos-

Figura 7. Diagramma di purificazione della PrP27-30 da quantità ridotte di tessuto cerebrale.



sibile distinguere tipi ("glicotipi") diversi di PrP²⁷⁻³⁰ (fig. 8). Alcuni di questi glicotipi possono supportare l'identificazione di forme specifiche di EST. In particolare si è visto che la BSE e tutte le forme ad essa connesse (sia sperimentalmente che accidentalmente) inclusa la nvMCJ producono glicotipi molto simili tra loro che si distinguono da quelli delle altre EST.

Figura 8. Western blot della PrP²⁷⁻³⁰ di tipo 1 (corsia 1) e 2 (corsia 2) purificata da tessuto cerebrale di pazienti affetti da MCJ sporadica. A lato sono indicati i pesi molecolari in kDa.



La PrP^{sc} si accumula solo nel cervello dei soggetti affetti da encefalopatie spongiformi e pertanto la sua identificazione all'immunoblot conferma la diagnosi clinica con una specificità maggiore dello stesso riscontro neuropatologico. Se eseguito correttamente, il test della PrP^{sc} non dà risultati falsi positivi o falsi negativi ed è quindi un esame altamente specifico e sensibile. I limiti di questo test derivano dalla necessità di utilizzare tessuto non fissato o fissato in Carnoy e dal fatto che risulta positivo solo quando l'agente infettivo ha già da tempo cominciato a replicarsi nel SNC. Pertanto, durante la fase preclinica, che può durare da mesi ad anni, l'esame della PrP^{sc} sul tessuto cerebrale non può essere usato per distinguere il tessuto proveniente da un individuo infetto da quello di uno sano.

Nella nvMCJ, a differenza di altre EST umane, anche gli organi linforeticolari (tonsille, milza e linfonodi), dei soggetti clinicamente ammalati, sono sede di accumulo di PrP^{sc}. Pertanto in questi pazienti la western blot, come pure l'immunoistochimica, possono essere utilizzate per la conferma diagnostica ante mortem utilizzando campioni biotici.

4. Identificazione delle proteine 14-3-3

La diagnosi in vita delle EST umane si basa su criteri clinici ed è altamente predittiva soprattutto quando compare il tipico tracciato elettroencefalografico

con onde pseudoperiodiche trifasiche. Tuttavia l'EEG è tipico solo nel 60-80% dei casi di MCJ sporadica; inoltre, una lunga durata della malattia o un decorso clinico singolare rendono più arduo il compito di riconoscere le EST in fase clinica. A questo scopo sono stati recentemente messi a punto dei metodi di indagine che rendono più affidabile la diagnosi. Il test che ha fornito i risultati migliori consiste nella identificazione mediante western blot della proteina γ 14-3-3 nel liquido cefalorachidiano (LCR). Le 14-3-3 sono una famiglia di proteine citoplasmatiche coinvolte nella regolazione della proteina chinasi C, nella trasduzione del segnale e nel controllo dei danni al DNA prima della mitosi. La loro presenza nel LCR è indice di intensa perdita neuronale e di acuto danno cerebrale. E' possibile difatti rinvenirle in elevate quantità nel LCR di individui colpiti da patologie del sistema nervoso accompagnate da morte neuronale, come ad esempio l'infarto cerebrale acuto o le encefaliti di origine batterica o virale.

Il liquor prelevato (1-2 ml) viene manipolato all'interno di una cappa biologica a flusso laminare di tipo II da un operatore provvisto di abbigliamento protettivo, e diviso in aliquote da 50 μ l che vengono essiccate mediante Speed Vac Sc-100 (Savant). I 50 μ l di liquor secco sono sospesi in 15 μ l di tampone di Laemmli, denaturati per 5' a 100°C e caricati in un minigel al 12.5% di poliacrilammide con SDS. Si effettua la corsa elettroforetica per circa 1 ora a corrente costante di 30 mA a 15°C.

Al termine della corsa le proteine vengono trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante western blotting. Il gel viene poi colorato con nitrato d'argento (metodo standard). La membrana dopo saturazione dei siti non occupati, viene incubata con una soluzione contenente un anticorpo policlonale di coniglio anti-14-3-3 (Santa Cruz Biotechnology) e quindi con un anticorpo secondario legato con fosfatasi alcalina. Le bande della γ 14-3-3 vengono evidenziate con un substrato cromogeno per la fosfatasi alcalina. Al termine della reazione la γ 14-3-3 appare come una sottile banda del peso di 30 kDa.

Altri marker liquorali di danno cerebrale (enolasi neuronale specifica, proteina S100b, proteina tau) sono presenti nei pazienti con MCJ, ma la loro bassa specificità rende questi test di scarsa utilità diagnostica.

L'individuazione mediante immunoblot delle proteine 14-3-3 nel LCR rappresenta una metodica più sensibile e specifica di qualsiasi altro test strumentale o di laboratorio (EEG a parte) per la diagnosi della MCJ sporadica, e fornisce un'informazione fondamentale specialmente nei casi che non mostrano il tipico tracciato EEGrafico. La specificità di questo esame in pazienti affetti da disturbi cognitivi

con sospetto clinico di MCJ è superiore al 90%; la sensibilità si aggira attorno al 90% nei casi di MCJ sporadica.

5. Amplificazione ed analisi di restrizione del gene *PRNP*

Il gene *PRNP* viene studiato estraendo il DNA genomico da campioni di tessuto cerebrale congelato o dal sangue. Il test genetico deve essere eseguito solo dopo aver ottenuto dal paziente o da chi ne fa le veci il consenso informato scritto.

La procedura di estrazione del DNA viene eseguita con una metodologia standard che consiste nel lisare le cellule e nel trattare il lisato così ottenuto con proteinasi K in presenza di SDS, per inattivare gli enzimi e degradare le altre proteine. Gli acidi nucleici vengono estratti mediante una miscela contenente fenolo, che ha il compito di separare dal lisato le proteine già digerite, e cloroformio/alcool isoamilico, che deproteinizza ulteriormente e separa il fenolo dalla fase acquosa in cui si trova il DNA. Dopo centrifugazione in microcentrifuga a massima velocità per 10 minuti, le proteine rimangono all'interfaccia tra la fase fenolica, sul fondo, e la fase acquosa, che contiene il DNA, sulla superficie. Dopo aver aspirato la fase acquosa si ripete l'estrazione in fenolo/cloroformio/alcool isoamilico ed infine il DNA contenuto nella fase acquosa viene precipitato con Na acetato (concentrazione finale 0.3 M) e con 2 volumi di etanolo assoluto freddo. Dopo aver agitato delicatamente, il DNA appare come un gomitolo biancasto; si elimina allora l'etanolo e si risospende il DNA in acqua o in Tris/EDTA.

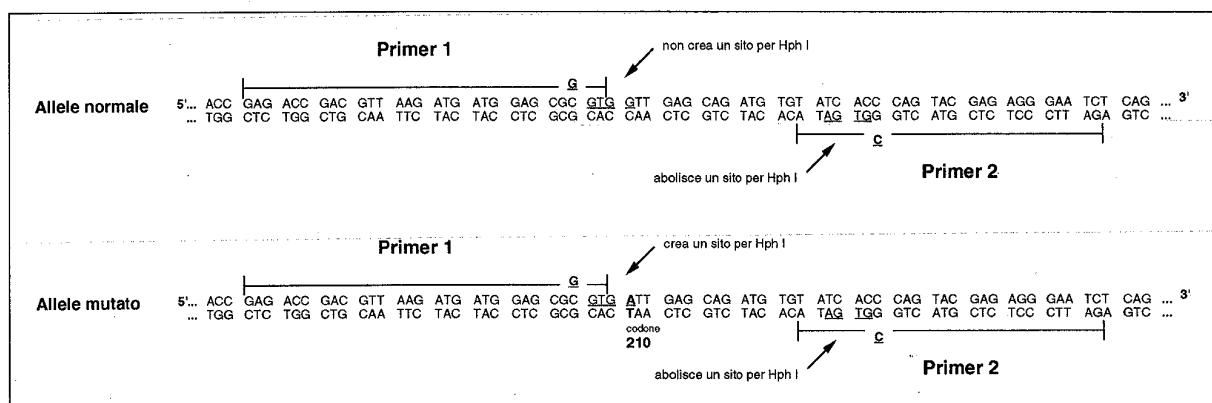
Per quantificare il DNA e calcolarne la purezza si sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire i raggi UV a 260 nm e a 280 nm: il coefficiente di estinzione di 50µg di DNA a doppia elica corrispon-

de a circa 1 unità di assorbanza. La concentrazione espressa in µg/ml è data dal prodotto della lettura a 260 nm per il fattore di diluizione per 50 (valore del coefficiente di estinzione). Il rapporto di estinzione tra la lettura spettrofotometrica a 260 nm e quella a 280 nm fornisce informazioni sul grado di purezza del DNA: questo è tanto maggiore quanto più il rapporto è vicino al valore di 1.8. Se tale rapporto aumenta e si avvicina a 2-2.2 significa che il campione è contaminato con RNA, mentre se diminuisce che è contaminato con proteine o con fenolo.

Il gene *PRNP* viene amplificato mediante PCR usando due primer contenenti sequenze relative alle due estremità del gene in esame. L'oligonucleotide corrispondente all'estremità 5' del gene è di 44 bp e ha la seguente sequenza: TAC TGA GCG GCC GCG CAG TCA TTA TGG CGA ACC TTG GCT GCT TGG. I primi 6 oligonucleotidi (semplice sottolineatura) sono scelti in maniera casuale, i seguenti 8 nucleotidi (doppia sottolineatura) corrispondono al sito di restrizione dell'enzima NotI e gli ultimi 30 nucleotidi (non sottolineati) alla sequenza specifica del gene *PRNP*. L'oligonucleotide che corrisponde all'estremità 3' del gene è di 42bp e ha la seguente sequenza: TAC TGA GTC GAC CCT TCC TCA TCC CAC TAT CAG GAA GAT GAG che consiste di 6 nucleotidi random seguito da 6 nucleotidi corrispondenti al sito di restrizione Sall e da 30 nucleotidi della sequenza specifica del gene. L'introduzione dei siti di restrizione nei primer permette l'eventuale clonaggio del gene nel plasmide pGEM-5Z (f+) in caso si volesse effettuare la sequenza completa.

L'amplificazione consiste in 30 cicli e ciascun ciclo comprende la denaturazione a 94°C per 30 secondi, l'ibridizzazione a 62°C per 30 secondi e l'estensione a 72°C per 60 secondi (Gene Amp 9600, Perkin-Elmer-Cetus). Per eseguire lo screening delle muta-

Figura 9. La figura mostra il principio della tecnica di PCR che crea/abolisce un sito di restrizione per lo screening della mutazione al codone 210 del gene *PRNP*. Notare come il primer 1 crea un sito di restrizione per Hph I (GGTGA, sequenza sottolineata) solo nell'allele mutato, mentre il primer 2 lo abolisce in entrambi gli alleli.



zioni note, l'amplificato viene digerito con l'enzima di restrizione specifico per la mutazione e/o il polimorfismo da esaminare (vedi tabelle 4 e 5) usando tamponi e temperature di reazione specifiche per ogni enzima, come riportato dalle ditte fornitrici. Il DNA così digerito viene esaminato su gel di agarosio contenente bromuro di etidio ed i frammenti vengono visualizzati in luce ultravioletta.

Poiché la mutazione al codone 210 non crea né abolisce alcun sito di restrizione, lo screening di tale mutazione viene eseguito mediante la tecnica di PCR che crea/abolisce un sito di restrizione (fig. 9). In questo caso si amplifica solo un piccolo frammento del gene utilizzando un primer all'estremità 5' (GAGACCGACGTTAAGATGATGGAGCGGGTG) che crea solo nell'amplificato dell'allele mutato un sito di restrizione per l'enzima Hph I e quello all'estremità 3' (GATTCCCTCTCGTACTGCGTGATA) che abolisce il sito di restrizione per lo stesso enzima normalmente presente al codone 198 del gene.

Lo studio del gene *PRNP* è raramente utile ai fini diagnostici, poiché nella MCJ sporadica non vi è alcuna alterazione del gene. Nei casi di MCJ in cui vi sia una sospetta familiarità per la malattia ed in tutti i casi di GSS e di FFI, è invece importante effettuare lo studio del gene *PRNP* nel paziente e nei familiari ed offrire consulenza genetica alle persone interessate. Per quanto riguarda le mutazioni descritte finora in Italia, i dati disponibili suggeriscono che le mutazioni al codone 102 ed al codone 178 hanno una penetranza completa, mentre quelle al codone 200 e 210 hanno una penetranza incompleta. La mutazione al codone 102 è sempre correlata con la GSS, mentre quella al codone 178 dà due malattie distinte a seconda che l'allele mutato presenti al codone 129 la sequenza ATG (codifica per metionina) o GTG (codifica per valina). Nel primo caso la malattia che ne risulta è la FFI, nel secondo caso la MCJ. Inoltre, quando è presente omozigosi al codone 129 (sia esso per metionina o per valina) le forme familiari hanno la tendenza a comparire in età più giovanile e con sintomatologia più grave. Per quanto riguarda le altre mutazioni non si hanno ancora dati sufficienti per poter affermare con certezza se abbiano o meno una penetranza completa.

La raccolta dei campioni per gli esami virologici e le procedure di decontaminazione

La biopsia cerebrale permette di ottenere sufficiente tessuto nervoso per misurare l'infettività o per identificare la PrPsc, tuttavia tale intervento non è consigliabile perché spesso ne consegue un peggioramento delle condizioni cliniche del paziente, che corre inoltre il rischio di infezioni. Nei casi in cui la biopsia ce-

rebrale è necessaria per poter distinguere la MCJ da sindromi neurologiche per le quali è possibile un trattamento farmacologico, il prelievo bioptico deve essere eseguito secondo modalità che garantiscano l'esito diagnostico ed evitino il contagio dell'operatore e riducano al minimo la contaminazione della sala operatoria e degli strumenti chirurgici. Il pezzo bioptico di corteccia cerebrale deve essere di circa 1 g, metà deve essere fissato in formalina tamponata per l'esame istopatologico, e l'altra metà congelata per la ricerca della PrPsc. L'operatore deve indossare camice, mascherina, occhiali protettivi, guanti antitaglio e guanti in lattice. In caso di contatto accidentale con materiale infetto, è necessario lavare accuratamente la parte interessata con acqua e sapone evitando l'uso di sostanze abrasive e, in caso di ferita, detergere la parte interessata con una soluzione 1 N di soda (40 g di NaOH in un litro di acqua). È opportuno collocare il paziente con sospetto di MCJ alla fine della lista operatoria della giornata per permettere un'adeguata disinfezione delle superfici della sala prima della successiva sessione. Per evitare la contaminazione della sala operatoria ricoprire le superfici con teli in plastica monouso. Le superfici che, nonostante questa precauzione, vengono a contatto con sangue od altro materiale biologico del paziente devono essere trattate con soda 2 N per almeno 1 ora. Questa procedura può danneggiare in maniera irreversibile gli oggetti di alluminio. In alternativa, si può utilizzare una soluzione di ipoclorito di sodio con una concentrazione di cloro libero superiore a 20000 p.p.m. che però è corrosiva sia per l'alluminio che per l'acciaio. Il materiale a perdere e l'abbigliamento protettivo utilizzato devono essere eliminati per incenerimento.

Le parti degli strumenti venute a contatto con tessuti ad alto rischio devono essere eliminate per incenerimento. Se non si possono interamente distruggere per incenerimento, prima di essere eliminate devono essere decontaminate mediante immersione in una soluzione di soda 1 N per un'ora o, in alternativa, in una soluzione di ipoclorito di sodio con 20000 p.p.m. di cloro libero per un'ora. Questo primo passaggio ha il doppio scopo di ridurre notevolmente la carica infettiva presente e quella di pulire gli strumenti da tessuti e liquidi biologici prima di essere trasferiti in buste di plastica e autoclavati a 134°C (3 bar di pressione) per almeno 1 ora (sono consigliabili due cicli di 1 ora ciascuno). È preferibile usare autoclavi che producono il vuoto prima dell'immissione del vapore, perché nelle autoclavi a percolazione per gravità, si possono formare delle bolle di aria a contatto con il materiale da sterilizzare, che impediscono la corretta sterilizzazione.

Si può evitare di contaminare alcune parti della strumentazione (che sarebbe costoso eliminare) ricorrendo con involucri di plastica.

Gli strumenti che sono stati utilizzati per prelevare materiale bioptico da un paziente con sospetto di MCJ possono essere messi in quarantena in contenitori sigillati. Solo nel caso in cui venga formulata una diagnosi definitiva diversa da MCJ, l'apparecchiatura potrà essere processata secondo le normali procedure di sterilizzazione, altrimenti dovrà essere trattata come abbiamo detto.

Gli strumenti adoperati per le indagini diagnostiche di laboratorio sul materiale infetto devono essere decontaminati con le stesse procedure descritte per gli strumenti bioptici.

Per quanto riguarda il prelievo autoptico si consiglia di aprire solo la scatola cranica per ridurre il rischio di contaminazione della sala settoria. Le modalità per il prelievo dell'encefalo sono descritte nelle "Linee guida e norme di sicurezza da osservare in caso di riscontro autoptico su soggetti con probabile malattia di Creutzfeldt-Jakob e sindromi correlate" approvate dal Consiglio Superiore di Sanità il 25 settembre 1996. Prima di fissare l'encefalo in formalina tamponata per l'esame neuropatologico è opportuno prelevare e congelare immediatamente un lobo frontale, un lobo occipitale ed un frammento di cervelletto (circa 10 g) per lo studio della PrPsc. Le procedure e le norme di sicurezza da seguire sono le stesse descritte per la biopsia.

I campioni di LCR devono essere prelevati mediante puntura lombare da sanitari informati del rischio connesso a tale operazione. Il personale deve indossare l'abbigliamento protettivo. Dopo la puntura lombare i campioni devono essere congelati a -80°C o a -20°C in attesa dell'analisi. Le provette non devono essere contaminate all'esterno e devono essere identificate con l'etichetta "Rischio Biologico". Quando la rachicentesi è eseguita al letto del malato, deve essere assicurata una pronta disinfezione dell'ambiente in caso di contaminazione con materiale biologico. Il materiale utilizzato deve essere eliminato per incenerimento.

L'esame genetico per la ricerca di mutazioni del gene *PRNP* può essere eseguito su un campione di sangue (10 ml di sangue in EDTA conservato a 4°C per 24 ore o a -20°C per tempo indefinito) che viene prelevato seguendo le procedure standard per i pazienti con malattie infettive. È importante tenere presente che, sebbene non sia mai stato dimostrato che le trasfusioni di sangue intero o l'uso di emoderivati possano trasmettere la MCJ sporadica, non si può completamente escludere il rischio di trasmissione. In particolare, nei casi di nvMCJ è possibile che il rischio sia più alto in funzione di un maggiore coinvolgimento del tessuto linforeticolare nell'infezione. Si consiglia pertanto di usare materiale a perdere e di decontaminare le superfici e gli oggetti venuti accidentalmente a contatto con il sangue.

Colture cellulari

La replicazione dell'agente dello scrapie in colture cellulari è stato l'obiettivo di numerosi tentativi sperimentali per i vantaggi che teoricamente si possono prevedere dallo sviluppo di un sistema "in vitro". Una linea cellulare infetta può infatti costituire una fonte alternativa di agente infettivo rispetto agli animali, consentire lo studio delle interazioni tra agente e cellula ospite, e lo sviluppo di un sistema per la titolazione dell'agente "in vitro".

I primi tentativi, purtroppo con risultati molto limitati, sono stati ottenuti con espianti di cervello provenienti da animali infettati sperimentalmente e mantenuti in coltura. Successivamente è stato possibile adattare in colture di origine neurale (neuroblastomi di topo, quali C-1300, N2a e NIE-115 ed il feocromocitoma di ratto PC12) alcuni ceppi infettanti adattati al topo ed in neuroblastomi umani (SHSY-5Y) dei ceppi di MCJ.

Cellule di neuroblastoma di topo (per esempio N2a) vengono seminate in bottiglie di 25 cm^2 con mezzo di coltura MEM + 10% siero fetale di bovino e portate a semiconfluenza. Per infettare le cellule si aspira il mezzo di coltura e si aggiungono $200\mu\text{l}$ di omogenato di cervello proveniente da un topo con scrapie sperimentale al 1% (peso:volume) in tampone fosfato, pH 7.2, e filtrato su membrane da $0.45\mu\text{m}$. Si aggiunge 1 ml di mezzo di coltura e quindi si incuba per 4 ore a 37°C su una piattaforma rotante. Si aggiungono altri 6-8 ml di mezzo di coltura e si lascia per altre 16 ore. Quindi si sostituisce il mezzo di coltura e si dividono le cellule quando raggiungono la confluenza. Le cellule infette mantengono un basso (circa 1 DL_{50} per 1000 cellule), anche se costante, livello di infettività per almeno una ventina di passaggi. Per aumentare il numero di cellule infette di circa 10 volte è possibile selezionare linee cellulari infette mediante clonazione.

Le colture infette producono PrPsc e ciò ha reso possibile l'approfondimento sulle conoscenze della biosintesi della PrP; tuttavia l'assenza di effetto citopatico rende impossibile la diretta titolazione dell'infettività che, peraltro, non raggiunge valori superiori a 1 DL_{50} per cellula. Queste colture inoltre, possono perdere l'infettività dopo alcuni passaggi e ciò rappresenta un altro limite nell'uso di questo modello per lo studio delle EST.

Ringraziamenti

Ringraziamo la signora Alessandra Garozzo per l'assistenza editoriale e la dottoressa Simona Bevivino per la lettura critica del manoscritto.

Bibliografia

- Agrimi U, Ru G, Cardone F, Pocchiari M e Caramelli M. Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet*, 353: 560-561, 1999.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schaulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D e Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature*, 390: 684-687, 1997.
- Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A, Goldfarb LG e Gajdusek DC. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Annals of Neurology*, 35: 513-529, 1994.
- Bruce ME. Scrapie strain variation and mutation. *British Medical Bulletin*, 49: 822-838, 1993.
- Bruce M, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttle A, McCordle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H e Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389: 498-501, 1997.
- Brunori M, Silvestrini MC e Pocchiari M. The scrapie agent and the prion hypothesis. *Trends in Biochemical Sciences*, 13: 309-313, 1988.
- Cardone F, Ladogana A, Ingrosso L e Pocchiari M. Encefalopatie spongiformi trasmissibili. *Enciclopedia Medica Italiana*, Aggiornamento II, Tomo I, USES, 1862-1880, 1998.
- Caughey B e Chesebro B. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends in Cell Biology*, 7: 56-62, 1997.
- D'Alessandro M, Petraroli R, Ladogana A e Pocchiari M. High incidence of Creutzfeldt-Jakob disease in rural Calabria, Italy. *Lancet*, 352: 1989-1990, 1998.
- Diringer H, Beekes M e Oberdieck U. The nature of the scrapie agent: The virus theory. *Annals of the New York Academy of Science*, 724: 246-258, 1994.
- Diringer H, Beekes M, Özel M, Simon D, Queck I, Cardone F, Pocchiari M e Ironside JW. Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirology*, 40: 238-246, 1998.
- Fraser H. Neuropathology of scrapie: the precision of the lesions and their significance. In *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, Prusiner SB e Hadlow WJ eds. Academic Press, New York, vol. 1, 387-406, 1979.
- Guarda F, Castiglione F, Agrimi U, Cardone F, Caracappa S, Pocchiari M. Bovine spongiform encephalopathy in Italy. *European Journal of Veterinary Pathology*, 1: 71-72, 1995.
- Hsich G, Kimbra K, Gibbs CJ Jr, Lee KH e Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *New England Journal of Medicine*, 335: 924-930, 1996.
- Ironside JW. Neuropathological diagnosis of human prion disease: morphological studies. In *Prion Diseases*, Baker HF e Ridley RM eds., Humana Press, Totowa, 35-57, 1996.
- Jarrett JT e Lansbury PT Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73: 1055-1058, 1993.
- Kimberlin RH e Walker CA. Transport, targeting and replication of scrapie in the CNS. In *Unconventional slow virus and CNS diseases*, Court LA et al. eds. Atelier d'Arts Graphiques, Abbaye de Melleray, 547-562, 1988.
- Ladogana A, Cardone F e Pocchiari M. Encefalopatia spongiforme bovina e malattia di Creutzfeldt-Jakob. *Giornale Italiano di Malattie Infettive*, 6: 327-336, 1996.
- Manson JC. PrP-deficient mice in the study of transmissible spongiform encephalopathies. In *Prion Diseases*, Baker HF e Ridley RM eds. Humana Press, Totowa, 237-249, 1996.
- Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SBH, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB e Weissmann C. A cellular gene encodes scrapie PrP²⁷⁻³⁰ protein. *Cell*, 40: 735-746, 1985.
- Pan KM, Baldwin MA, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE e Prusiner SB. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90: 10962-10966, 1993.
- Pocchiari M, Salvatore M, Cutruzzolà F, Genuardi M, Travaglini Allocatelli C, Masullo C, Macchi G, Alemà G, Galgani S, Xi YG, Petraroli R, Silvestrini MC e Brunori M. A new point mutation of the prion protein gene in Creutzfeldt-Jakob disease. *Annals of Neurology*, 34: 802-807, 1993.
- Pocchiari M. Prions and related neurological diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, 15: 195-291, 1994.
- Prusiner SB. Novel proteinaceous infection particles cause scrapie. *Science*, 216: 136-144, 1982.
- Prusiner SB, Collinge J, Powell J e Anderton B: *Prion diseases of humans and animals*. Ellis Horwood Series in Neuroscience, New York, 1992.
- Prusiner SB. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95: 13363-13383, 1998.
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R e Wüthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, 382: 180-182, 1996.
- Salvatore M, Genuardi M, Petraroli R, Masullo C, D'Alessandro M e Pocchiari M. Polymorphisms of the prion protein gene in Italian patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Human Genetics*, 94: 375-379, 1994.
- Silvestrini MC, Cardone F, Maras B, Pucci P, Barra D, Brunori M e Pocchiari M. Identification of the prion protein allotypes which accumulate in the brains of sporadic and familial Creutzfeldt-Jakob disease pa-

- tients. *Nature Medicine*, 3: 521-525, 1997.
- Westaway D. Transgenic approaches to prion "species barrier" effects. In *Prion Diseases*, Baker HF e Ridley RM eds. Humana Press, Totowa, 251-263, 1996.
- Will RG, Ironside JW, Ziedler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A e Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347: 921-925, 1996.
- Xi YG, Cardone F e Pocchiari M. Detection of proteinase-resistant protein (PrP) in small brain tissue samples from Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Journal of the Neurological Sciences*, 124: 171-173, 1994.