

# EVIDENZIAMENTO DELLA PrP<sup>Sc</sup> IN UN VACCINO PER L'AGALASSIA CONTAGIOSA DEI PICCOLI RUMINANTI

NICOLA POZZATO, MARIA TERESA CAPUCCHIO, FRANCO GUARDA

*Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino  
Via Leonardo Da Vinci 44, 10095, Grugliasco (Torino), Italia*

## Riassunto

Gli autori descrivono il riscontro, mediante western-blot, dell'isoforma patologica della PrP (PrP<sup>Sc</sup>), in un campione di vaccino contro l'agalassia contagiosa prodotto in Italia alla fine del 1995 e utilizzato negli anni successivi in numerose aziende ovi-caprine per il controllo della patologia suddetta. I risultati ottenuti, in accordo con recenti studi epidemiologici, dimostrano che l'epidemia di scrapie verificatasi in Italia negli anni 1997-1999 potrebbe essere conseguente all'utilizzo di questo vaccino prodotto a partire da organi di pecore clinicamente sane che in realtà avevano la scrapie in incubazione.

## Summary

*The authors report the presence of the pathological isoform of PrP (PrP<sup>Sc</sup>) in a vaccine produced in Italy at the end of 1995 and used for the control of contagious agalactia in small ruminants. The results, in accordance with the recent epidemiological study, suggest that the cases of scrapie diagnosed in Italy in 1997-1999 could be related to the use of this contaminated vaccine produced from sheep organs that were in the preclinical stage of the scrapie.*

La scrapie è una encefalopatia spongiforme che colpisce, in condizioni naturali, le pecore, le capre ed i mufloni. In Italia, fino al 1997, questa malattia neurodegenerativa era stata osservata solo in un numero molto limitato di greggi per lo più ovin; negli ultimi tre anni però il numero dei focolai è andato progressivamente aumentando coinvolgendo inizialmente alcune aziende della regione Sicilia ed estendendosi successivamente a Puglia, Sardegna, Toscana, Emilia Romagna, Piemonte, Basilicata, Abruzzo e Lazio fino ad un totale di 43 focolai (C.E.A. 30-11-1999).

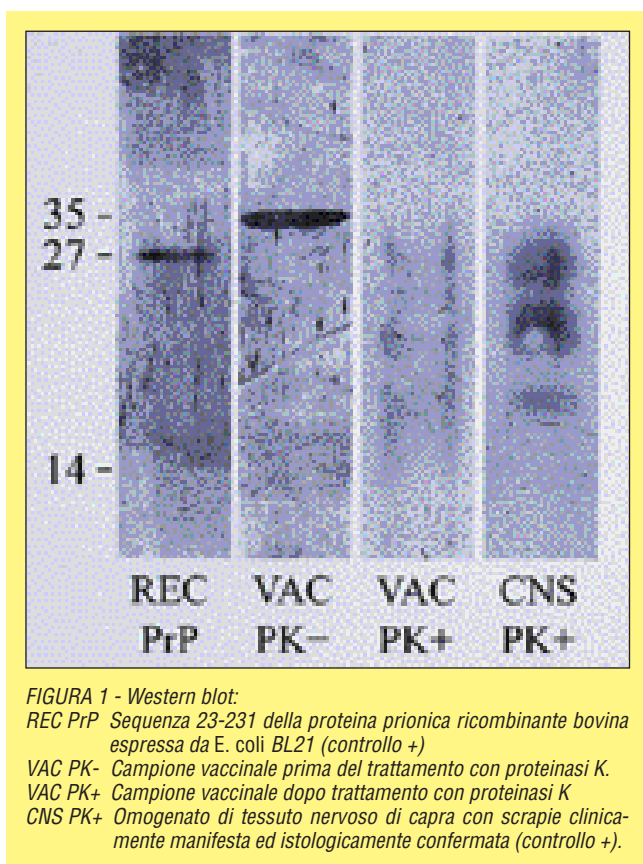
Il presente lavoro prende in considerazione tre focolai verificatisi in Sicilia nel 1997. Interessante caratteristica di questa epidemia è stata in particolare l'alta incidenza della malattia fra i caprini (fino al 60%) e la breve durata della fase clinica che, all'inizio dell'insorgenza della patologia nel gregge, non superava le 2-3 settimane (Capucchio et al., 1998; Di Marco et al., 1999). I dati rilevati depongono per il sospetto fondato che la fonte del contagio sia un vaccino contro l'agalassia contagiosa prodotto a partire da organi di pecora e precisamente da omogenati di tessuto nervoso e ghiandola mammaria di pecore infettate con *Mycoplasma agalactiae* (Capucchio et al., 1998). Il vaccino, inattivato con formalina, sarebbe stato pertanto prodotto con tessuti di animali infetti da scrapie ed il trattamento di

inattivazione, come è universalmente noto, sarebbe risultato del tutto inefficace nel ridurre il titolo di infettività attribuibile al prione (Taylor et al., 1992). Sinora l'unico caso di trasmissione iatrogena della scrapie con un vaccino è stato descritto in Scozia alla fine degli anni trenta; si è trattato in tal caso di una vera epidemia poiché 18.000 pecore furono inoculate con un vaccino per la louping-ill contaminato ed il periodo di incubazione fu di 20 mesi circa (Gordon, 1946; Greig, 1950).

Nel presente lavoro gli autori descrivono il riscontro dell'isoforma patologica della PrP, la PrP<sup>Sc</sup>, in un campione di vaccino contro l'agalassia contagiosa, prodotto in Italia alla fine del 1995 e successivamente utilizzato, per via sottocutanea, da numerosi allevatori per il controllo della suddetta patologia negli ovi-caprini di età superiore ai 60 giorni.

## MATERIALI E METODI

Campioni appartenenti a 5 lotti di vaccino, inviati al Dipartimento di Patologia Animale da un allevatore e prodotti durante gli anni 1995-96, sono stati analizzati per verificare l'eventuale presenza della PrP<sup>Sc</sup> mediante western-blot.



50 µl di sospensione vaccinale e 7 µl di sarkosyl 10% (pH 7,4) sono stati incubati per 30 minuti a 37°C con e senza 10µg di proteinasi K. Dopo l'aggiunta di Laemmli-sample buffer i campioni sono stati bolliti per 5 minuti e successivamente sottoposti a separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide al 13,5%. Come controlli positivi sono stati utilizzati la sequenza 23-231 della proteina prionica ricombinante bovina purificata (REC PrP) ed un omogenato di tessuto nervoso, trattato con proteinasi K, di una capra con scrapie (CNS PK+) purificato secondo la procedura di Beekes et al. (1995).

Dopo blottaggio su membrane di PVDF, queste ultime sono state incubate con un anticorpo policlonale specifico per la proteina prionica ricombinante bovina, quindi con un anticorpo secondario coniugato con fosfatasi alcalina. Le bande sono state visualizzate mediante l'utilizzo di X fosfato - 5 bromo - 4 cloro - 3 indoli fosfato/ nitroblu di tetrazolio (BCIP/NBT) come substrato cromogeno.

## RISULTATI

Come si può vedere nella Figura 1 il campione vaccinale dopo trattamento con proteinasi K (VAC PK+) mostra una banda principale di 27KDa e due bande minori. Questo risultato è stato ottenuto con un solo lotto vaccinale e precisamente quello prodotto verso la fine del 1995. Le tre bande sono molto simili a quelle osservabili nel campione di tessuto cerebrale di una capra con scrapie clinicamente manifesta e confermata istologicamente (CNS PK). Secondo gli autori la quantità di PrPSc presente in 1 ml di vaccino è di circa 2 µg, la stessa che generalmente si trova in 0,5-1 g di tessuto nervoso di animali con scrapie.

Tutti gli altri lotti vaccinali analizzati hanno dato esito negativo con la tecnica di western-blot.

## CONCLUSIONI

I risultati degli autori sono in accordo con i dati ottenuti da recenti studi epidemiologici di Agrimi et al. (1999). Questi ultimi hanno infatti evidenziato la correlazione tra alcuni focolai di scrapie e l'uso di questo vaccino che sarebbe stato utilizzato in 15 dei 20 greggi ovi-caprini durante gli anni 1995 e 1996 lasciando pertanto intercorrere un periodo di 23-35 mesi tra l'uso del vaccino e l'insorgenza della malattia. La mancanza di segni clinici tipici della scrapie negli ovini i cui tessuti sono stati utilizzati nella preparazione del vaccino non consente di escludere l'ipotesi del vaccino contaminato poiché gli animali potevano essere in uno stadio preclinico della malattia (Agrimi et al., 1999). Infatti, anche se gli organi utilizzati per la produzione del vaccino appartenevano a pecore clinicamente sane, allevate in aziende apparentemente indenni da scrapie, è ben noto che il periodo di incubazione di tale malattia può essere più lungo del ciclo vitale degli animali e che pertanto alcuni soggetti possono essere affetti da scrapie in fase preclinica (Dickinson et al., 1975; Guarda et al., 1976).

Sfortunatamente gli autori non hanno potuto conoscere i dettagli sulla produzione del vaccino, il numero del lotto, la distribuzione di tale lotto sul territorio e tanto meno se siano ancora disponibili stock di tale vaccino inutilizzati. La mancanza di PrPSc nei lotti prodotti ed utilizzati in campo nel 1996 suggerisce che il vaccino contaminato sia stato esclusivamente quello prodotto alla fine del 1995; la lieve diminuzione dei casi di scrapie sul territorio italiano dopo il 1998 sembra confermare l'ipotesi suddetta. Pertanto si può dedurre che non tutti i lotti vaccinali utilizzati in campo contenessero materiale infetto anche se il numero di lotti esaminato è stato molto esiguo, insufficiente per stabilire l'entità della contaminazione.

Gli autori ritengono che i risultati raggiunti con questa ricerca rappresentino l'ultimo e conclusivo anello diagnostico per dimostrare l'eziologia dell'epidemia di scrapie verificatasi negli anni 97-99 in Sicilia ed in altre regioni italiane. D'altra parte, sin dall'inizio dell'epidemia di scrapie, gli autori avevano emesso per primi quest'ipotesi (Guarda et al., 1997). A conferma di quanto sopra scritto, in altri lavori, eseguiti sull'argomento, emergono fondati sospetti sull'origine iatrogena dell'epidemia (Agrimi et al., 1999; Caramelli et al., 1999).

In conclusione si può affermare che è stato un grosso rischio produrre un vaccino per i piccoli ruminanti utilizzando tessuto nervoso poiché, come è già stato sottolineato, ovini clinicamente sani possono essere infetti.

## Parole chiave

Vaccino, piccoli ruminanti, western-blot, PrPSc, scrapie.

## Key words

Vaccine, small ruminants, western-blot, PrPSc, scrapie.

## Bibliografia

- Agrimi, U., Ru, G., Cardone, F., Pocchiari, M., Caramelli, M. (1999). Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *The Lancet* 353(9152): 560-561.
- Beekes, M., Baldauf, E., Cassens, S., Diringer, H., Keyes, P., Scott, A. C., Wells, G. A., Brown, P., Gibbs, C. J. Jr., Gajdusek, D. C. (1995). Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *Journal of General Virology* 76(Pt 10): 2567-76.
- Capucchio M. T., Guarda F., Isaia M. C., Caracappa S., Di Marco V. "Natural occurrence of scrapie in goats in Italy" (1998) *Veterinary Record* 143(16):452-3.
- Caramelli M., Bozzetta E., Casalone C., Ru G., Acutis P.L., Santagada G.F., Bacchiocchi S., Calella A.M., Forloni G.(1999). A detailed study of a recent scrapie outbreak in sheep and goats in Southern Italy. Symposium on: "Characterization and diagnosis of prion diseases in animals and man" Tubingen, 23-25/09/1999:116.
- Dikinson A.G., Fraser H., Outram G.W. (1975). Scrapie incubation time can exceed natural lifespan. *Nature* 256:732.
- Di Marco V., Guarda F., Capucchio M.T., Fiasconaro M., Cannata A., Nifosi D. (1999) Quadro clinico della scrapie negli ovi-caprini. *Large Animals Review* 5(2): 79-86.
- Gordon, W. S. (1946). Advances in veterinary research. *Veterinary Record* 58(47): 516-9.
- Greig J.R. (1950). Scrapie in sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 60: 263- 266.
- Guarda F., Capucchio M.T., Isaia M.C., Di Marco V., Caracappa S. (1997) La scrapie in tre allevamenti caprini in Sicilia. *Large Animals Review* 3(3): 69-74.
- Guarda F., Cravero G., Rossi C. Importanza attuale della neuropatologia delle infezioni lente da virus negli animali e nell'uomo. (1976). *Il Nuovo Progresso Veterinario*, 891-902.
- Taylor, D. M. (1992). Inactivation of unconventional agents of the transmissible degenerative encephalopathies. Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization. W. B. H. A.D. Russell, G.A.J. Ayliffe. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 171-9.