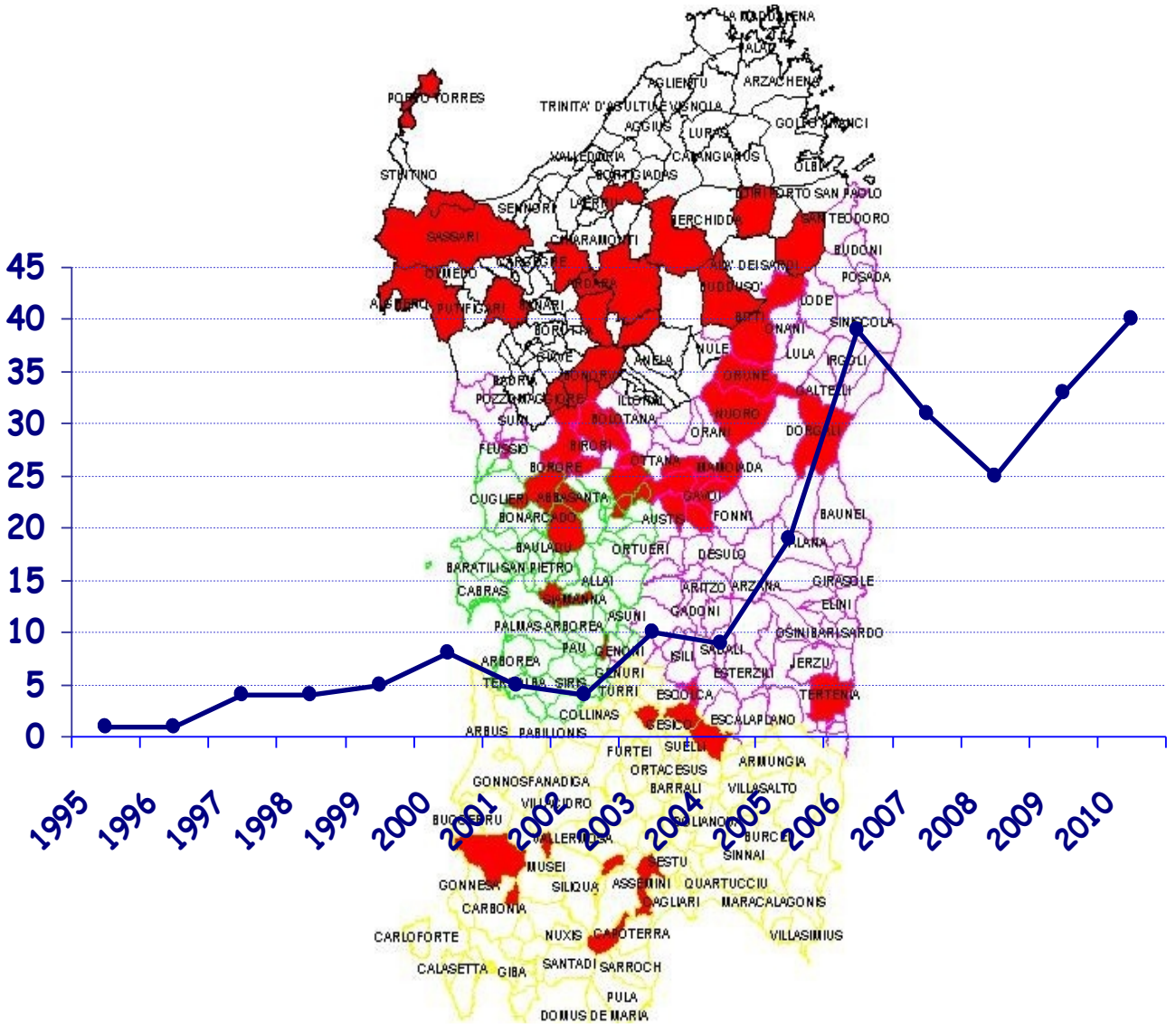
IDENTIFICAZIONE DI FATTORI DI RISCHIO CHE INFLUENZANO LA DIFFUSIONE DELLA SCRAPIE OVINA E CAPRINA. UNA *OVERVIEW* SUI RISULTATI OTTENUTI DOPO 6 ANNI DI RICERCHE.

Ciriaco Ligios
IZS della Sardegna

SERVE SPENDERE (INVESTIRE) NELLA LA RICERCA IN SANITA' PUBBLICA ?

LE RAGIONI DELLA RICERCA IN SANITA' PUBBLICA


45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
PORTO TORRES
STINTINO
SASSARI
ALGHERO
BORUTTA
BONORVA
SUNI
BOLOTANA
ORANI
NUORO
ORUNE
OLIENA
DORGALI
BUDONI
POSADA
SINISCOLA
IRGOLI
LULA
GALTELLI
LODE
ARZACHENA
OLBIA
TORTO SAN PAOLO
SAN TEODORO
PALAU
LA MADDALENA
TRINITA' D'AGULTU E VENOLA
AGLIENTU
AGGIUS
LURAS
CALANGIANUS
VALLEDORIA
BORTIGIADAS
SENNORI
LAERU
CHERCHIDA
CHIARAMONTI
OSSI
USINI
OSILO
ITTIRI
FLUMINIMAGGIORE
ILLORAI
FEUSSO
BIRORI
BORORE
OTTANA
MAMOIADA
OLLOLAI
OLLOLAI
OLLOLAI

Encefalopatie Spongiformi Animali

Malattia	Ospite	Eziologia
1) Scrapie	Pecora, capra, muflone	Infezione naturale
2) Scrapie atipica (Nor 98)	Pecora	??????????
3) CWD	Cervo	Infezione naturale
4) BSE	Bovino	Ingestione alim. Contam.
5) BASE	Bovino	????????????
6) ETV	Visone	Sconosciuta
7) EST	Gatto	Ingestione alim.
9) TSE animali da zoo	Anim. zoo	Ingestione alim.

COSA ABBIAMO STUDIATO

Infezione naturale

Trasmissione

Genetica

L’eziologia della scrapie

Le conoscenze sulla genetica della scrapie :

Polymorphisms are classified as follows: at codon 136, valine (V) is associated with high scrapie susceptibility while alanine (A) is associated with low susceptibility, although this might depend on the strain of scrapie agent (Goldmann et al. 1994). At codon 154, arginine (R) is associated with susceptibility while histidine (H) is associated with partial resistance. At codon 171, glutamine (Q) and histidine (H) are associated with susceptibility while arginine (R) is associated with resistance (Baylis et al. 2004)

Journal of Applied Microbiology 2005, **98**, 1294–1302 doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02568.x

Frequencies of *PrP* gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes

W. Goldmann[1], M. Baylis[2], C. Chihota[2], E. Stevenson[2] and N. Hunter[1]

[1]Neuropathogenesis Unit, Institute for Animal Health, Edinburgh, UK, and [2]Compton Laboratory, Institute for Animal Health, Compton, Berkshire, UK

2004/0920: received 9 August 2004, revised 7 December 2004 and accepted 8 December 2004

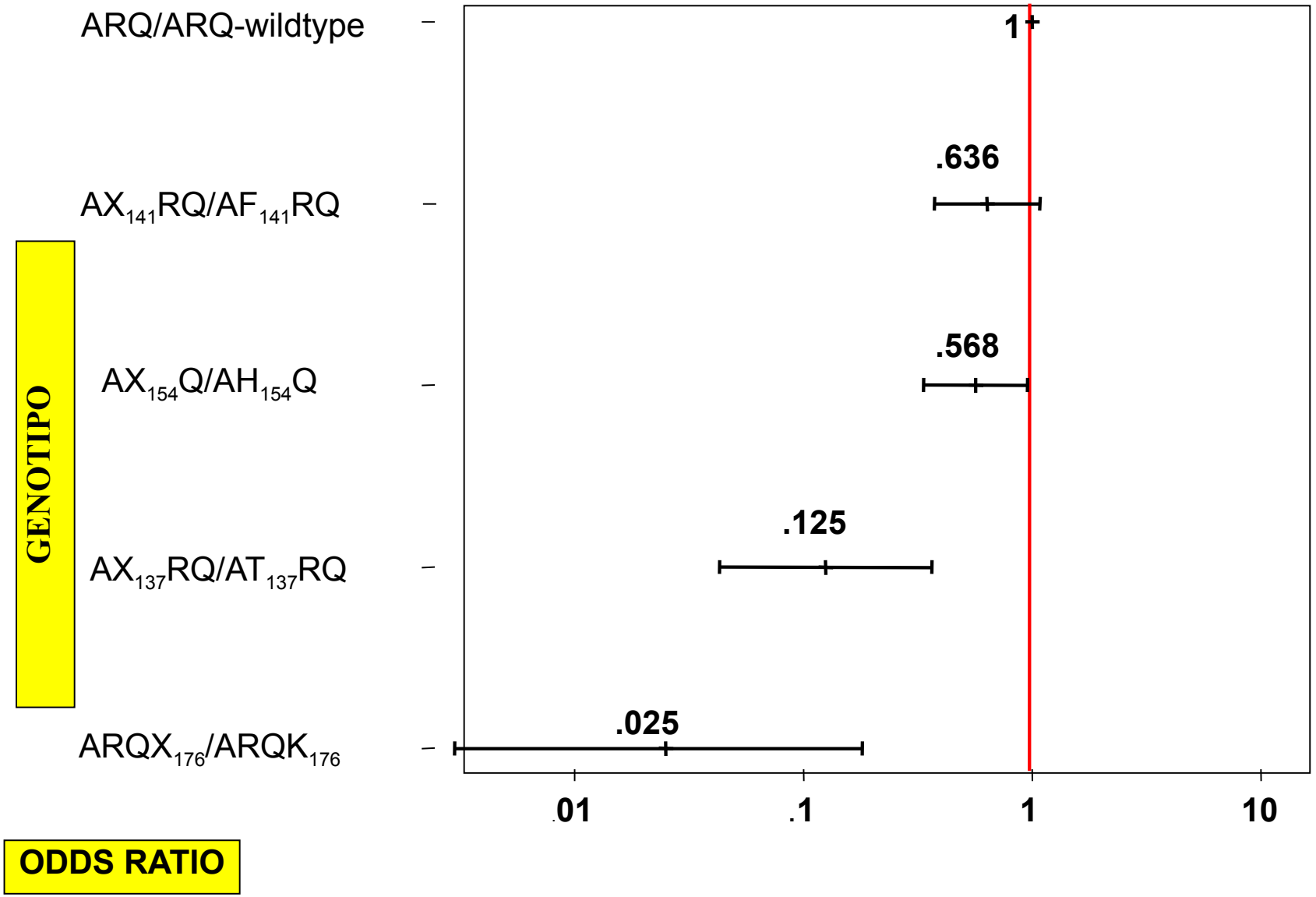
LA SCRAPIE: COLPISCE GLI ANIMALI CON GENOTIPO ARQ/ARQ, TALVOLTA GLI ETEROZIGOTI E QUASI MAI GLI ARR/ARR

Flock	No sheep	Genotype	No Sheep affected ARQ/ARQ	Investigated tissues	
				IHC	W B
A	61	ARQ/ARQ (29) ARQ/ARR (25) ARR/ARR (7)	12 (41.3%)	Obex, tonsil, retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, spleen, ileocoecal junction	Obex, tonsil, retropharyngeal and mesenteric lymph nodes, spleen
B	90	ARQ/ARQ (34) ARQ/ARR (44) ARR/ARR (12)	4 (11.7%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes
C	198	ARQ/ARQ (44) ARQ/ARR (103) ARR/ARR (51)	3 (6.8%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes
D	167	ARQ/ARQ (87) ARQ/ARR (67) ARR/ARR (13)	7 (8.0%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes
E	100	ARQ/ARQ (100)	12 (12%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes
F	50	ARQ/ARQ (50)	5 (10%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes
G	84	ARQ/ARQ (56) ARQ/AHQ (25) AHQ/AHQ (3)	8 (9.5%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes
H	300	ARQ/ARQ (105) ARQAR/R (151) ARR/ARR (44)	18 (17.1%)	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes	Obex, tonsil, retropharyngeal lymph nodes

Genotipo delle pecore malate

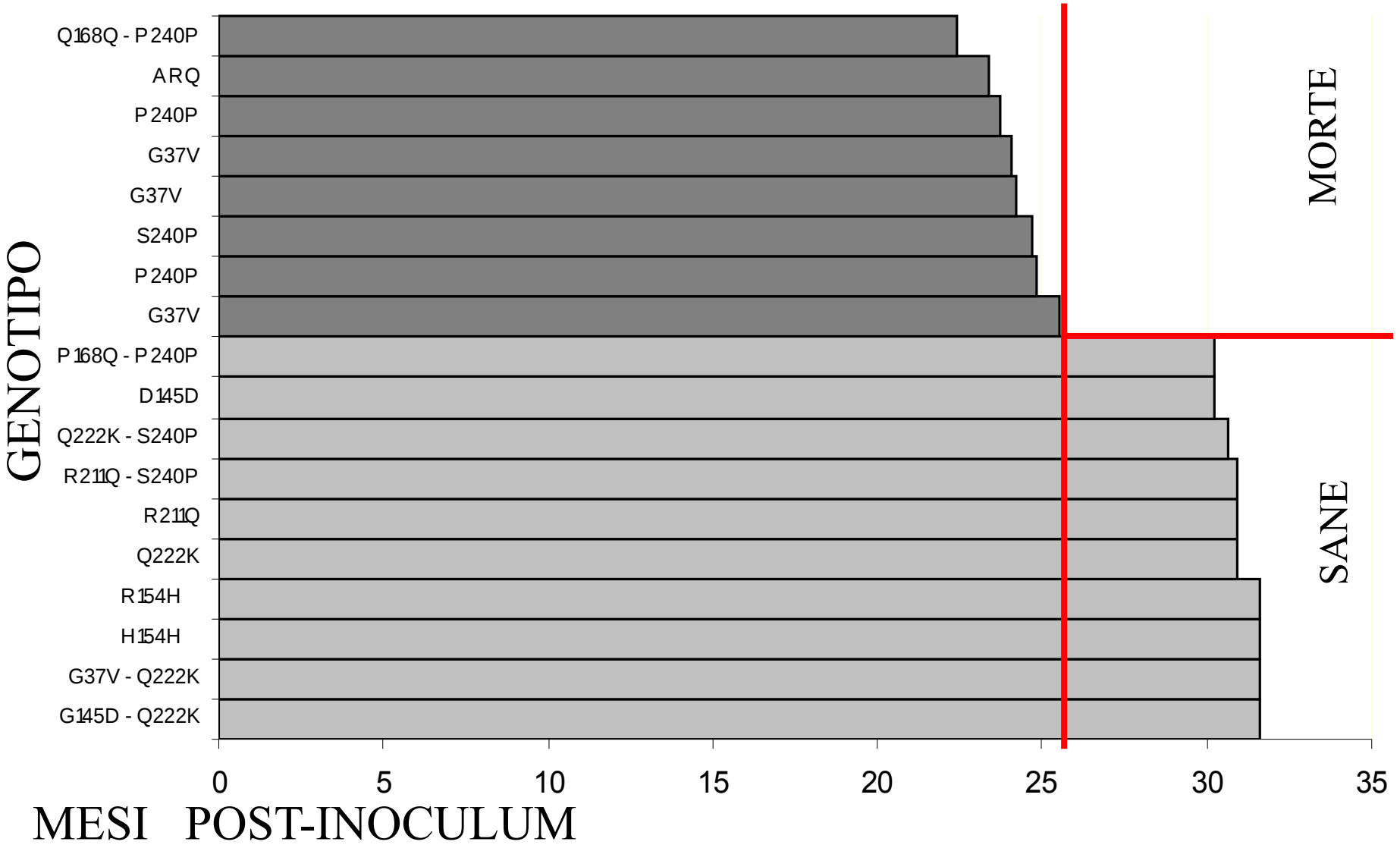
Table 3. PrP genotypes and results of PrP^{Sc} IHC and WB in the obex, LRS tissues, and ENS plexuses of the 49 clinical scrapie-affected sheep from the 8 flocks under study.

		Obex		LRS		ENS
No of sheep	**Genotype**	**IHC**	**B**	**IHC**	**WB**	**IHC**
45	**ARQ/ARQ**	+	+	+	+	+
1	**AHQ/ARQ**	+	+	+	+	+
3	**ARQ/ARQ**	+	+	-	-	+

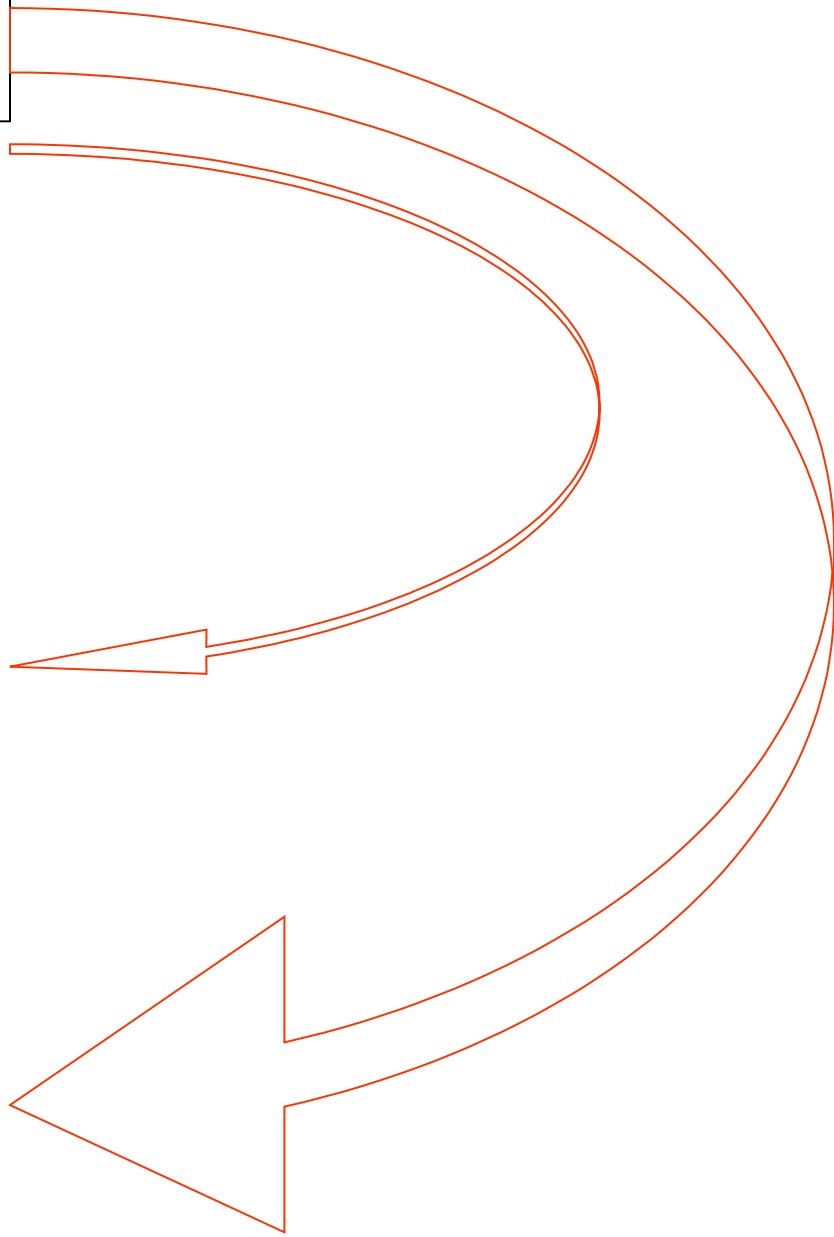


Ulteriori dimorfismi diminuiscono la suscettibilità alla scrapie in pecore ARQ/ARQ

La genetica nelle capre inoculate sperimentalmente



Fattori di rischio riportati in bibliografia.



•Greggi in selezione rispetto ai commerciali
•Parto in recinti comuni
•Parto negli stessi posti
•Alte quote di rimonta

McIntyre et al. (BMC Veterinary Research 2007)

•Dimensioni del gregge
•Utilizzo di certi concentrati e di latte artificiale.

Sandrine et al. (Emerging Infectious Disease 2005)

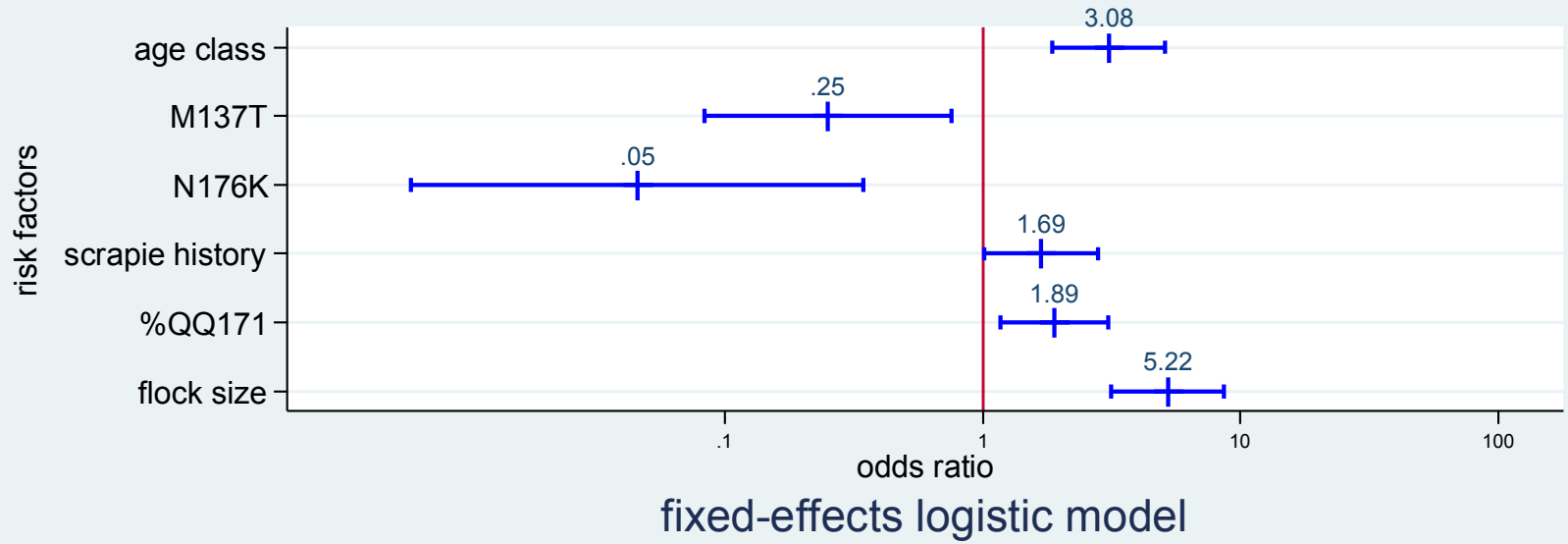
•Dimensioni del gregge

•Numero di costruzioni nella fattoria

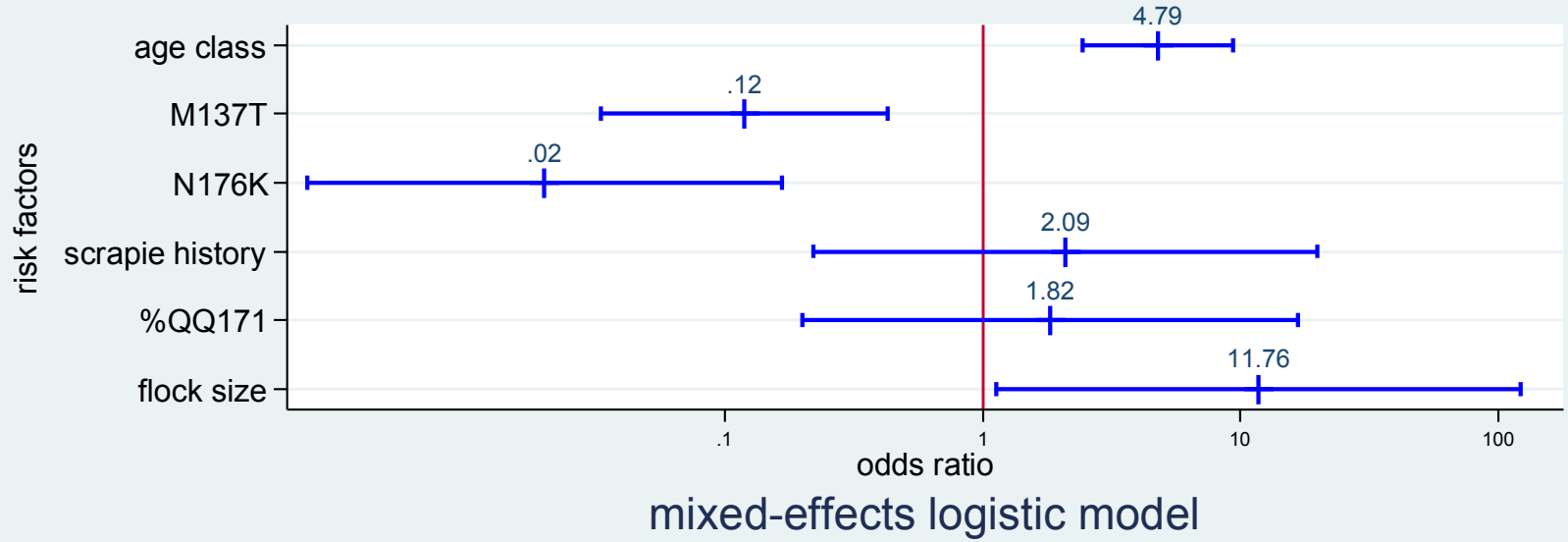
•Acquisto di riproduttori femmine

Hopp et al. (Prev. Vet. Med. 2001)

Risultati

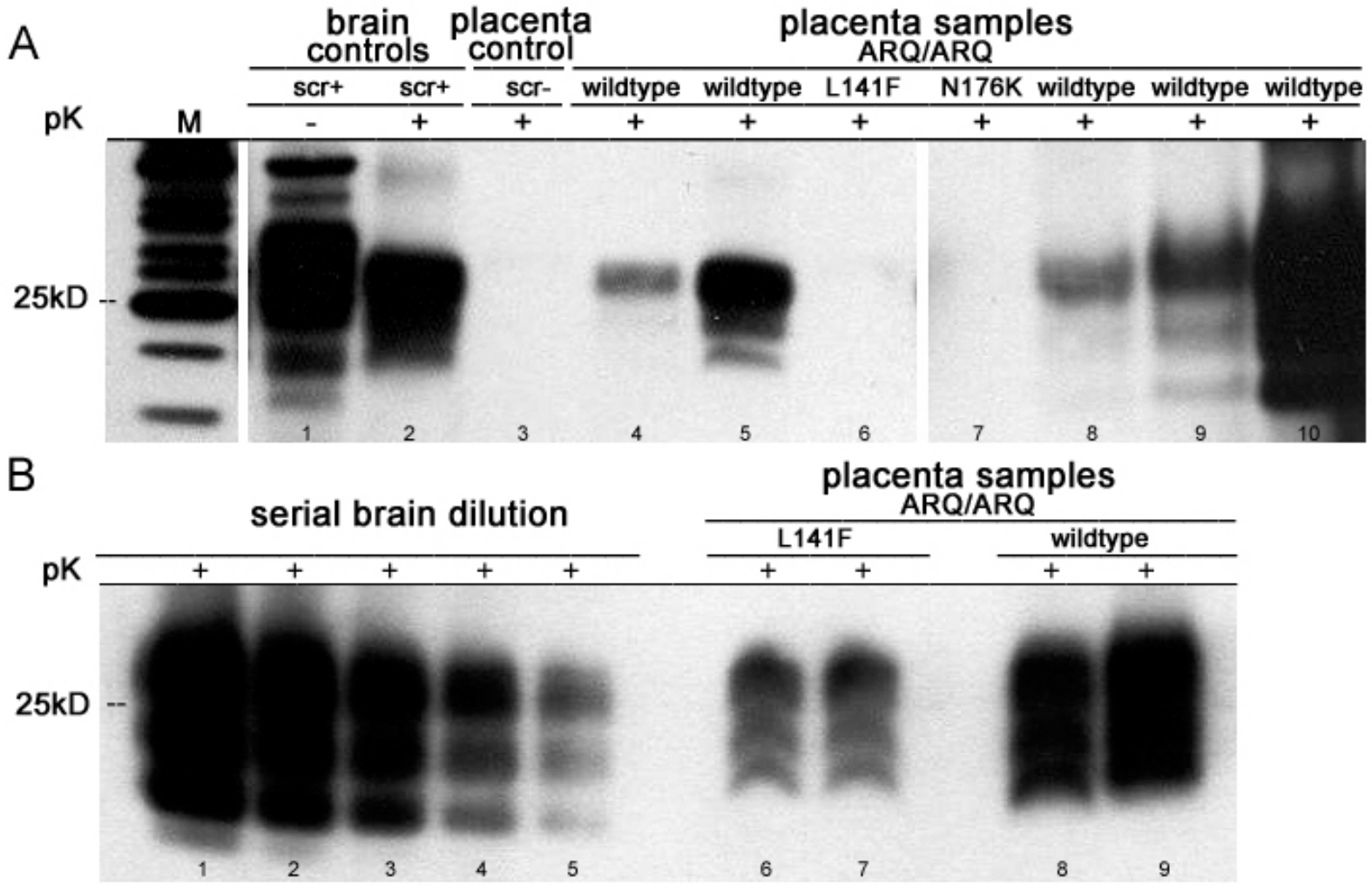


fixed-effects logistic model

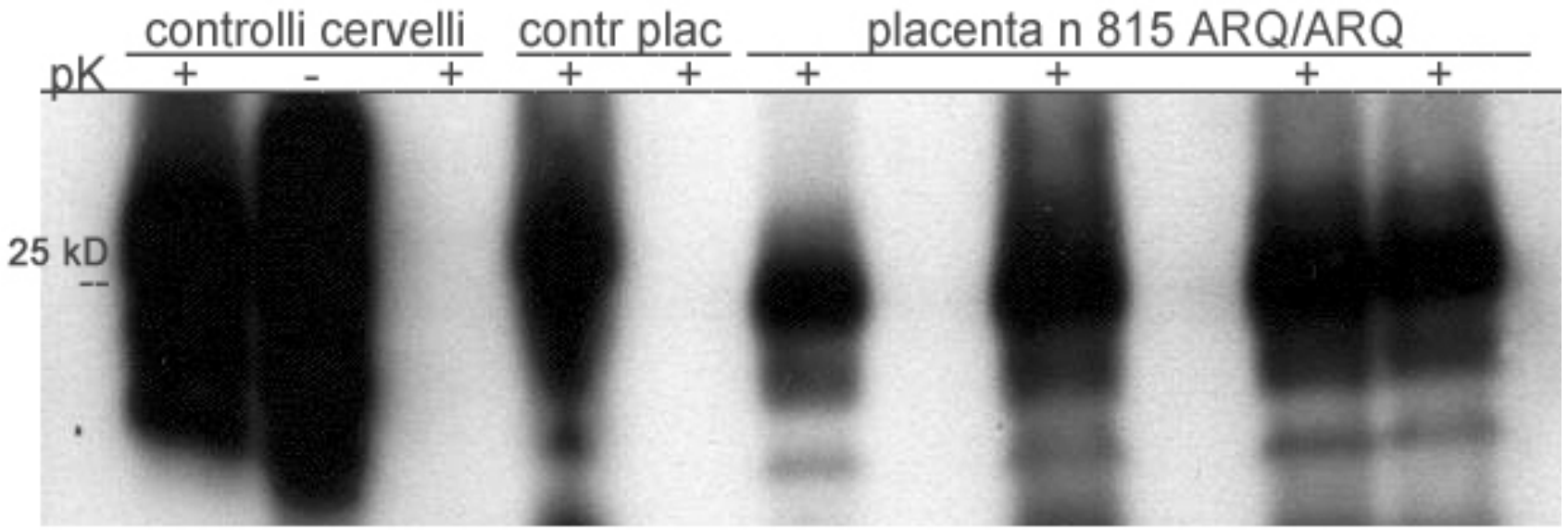


mixed-effects logistic model

Influenza di altri genotipi sulla deposizione di PrP^{Sc}



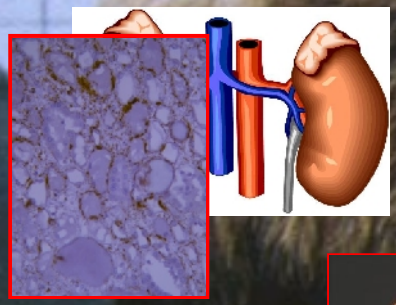
Le placente delle capre hanno lo stesso ruolo nella diffusione della scrapie ?



Genotipo placente

Q222K
R154H
P168Q-S240P
ARQ
ARQ
R211Q
S240P
S240P
G145D
Q222K
ARQ
G37V
S240P
ARQ
ARQ
S240P
S240P
R211Q
Q222K
Q222K
Q222K
S240P

La scrapie come malattia contagiosa



PrP^{Sc}

PrP^{Sc}

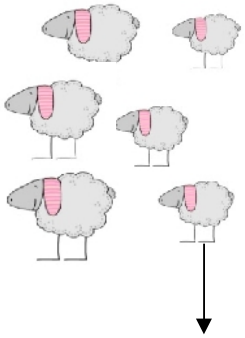
PrP^{Sc}

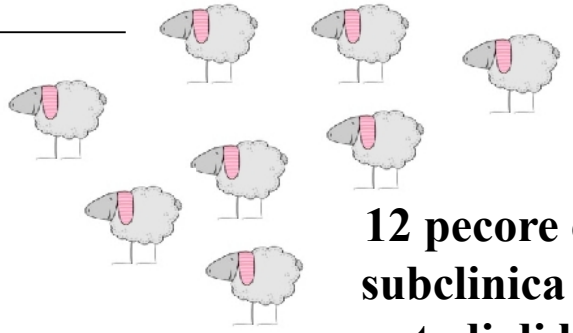
Infettività del latte cosa si sapeva

Konold et al. 2008

n. 18 agnelli neonati

Latte



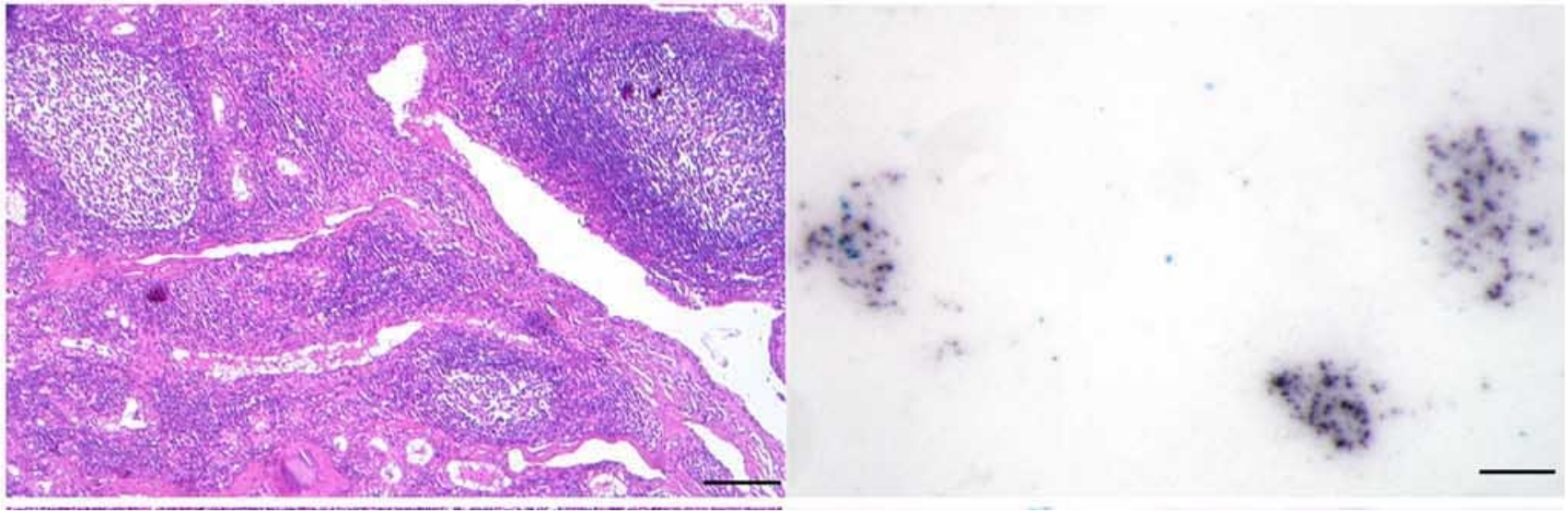


12 pecore con scrapie subclinica a differenti stadi di lattazione

7 mesi n. 15 (+) alle biopsie rettali

Lacroux et al. 2008

E’ stato dimostrato che PrP^{Sc} accumula oltre che nel cervello e negli organi linfatici anche in organi affetti da infiammazioni linfoproliferative. Questo è stato descritto in topi transgenici (Heinkewalder *et al.* Science 2005) ed ospiti naturali delle TSE come pecora (Ligios *et al.* 2005) e cervo (Hamir *et al.* 2006).



Resta da dimostrare cosa succede nel caso delle pecore ARQ/ARQ e come una mastite possa influire sul rilascio di infettività prionica nel latte.

<u>Un numero elevato di agenti virali e batteriologici causa mastite</u> !!!!!!!!

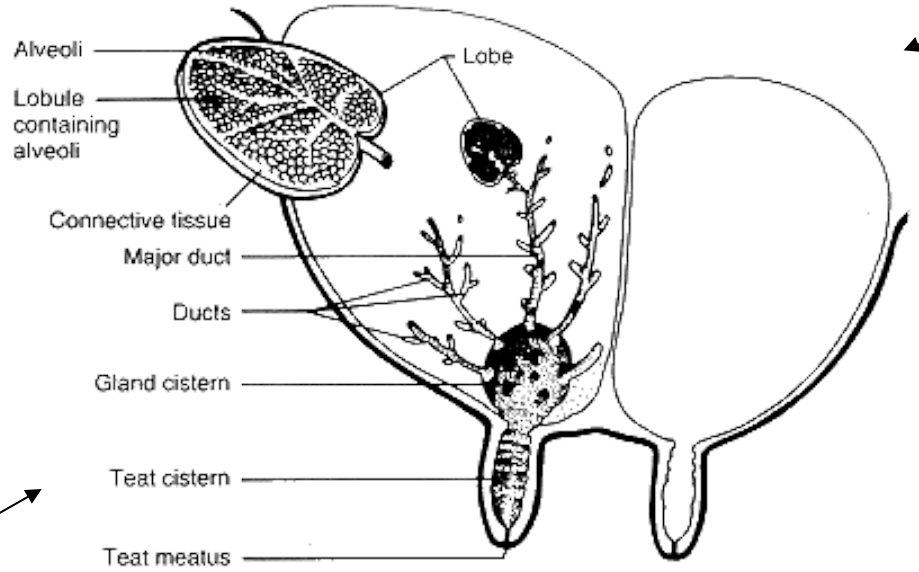
Mycoplasma sp.

Steptococcus sp.

Maedi-Visna virus (MVV)

E. coli

Staphilococcus sp.



Resulti della inoculazione orale ad agnelli di latte di pecore con scrapie e mastite o solo con scrapie.

# Agenlli riceventi (genotipo)	Inoculum	Inoculum totale (ml)	Razza	Sintom atologia	WB/IHC cervello	WB/IHC tonsilla	Mesi P.I.
326 (V_{127}ARQ/G_{127}ARQ)	Scrapie/Mastitis Milk	1,880	Sarda	No	-	-	28
327 (ARQ/$ARQ_{wildtype}$)	Scrapie/Mastitis Milk	1,410	Sarda	Yes	+/+	+/+	25
328 (V_{127}ARQ/G_{127}ARQ)	Scrapie/Mastitis Milk	1,815	Sarda	Yes	+/+	+/+	28
329 (ARQ/$ARQ_{wildtype}$)	Scrapie/Mastitis Milk	2,090	Sarda	Yes	+/+	+/+	25
843 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie/Mastitis Milk	1,250	Cheviot	No	+/+	+/+	28
847 (ARQ/$ARQ_{wildtype}$)	Scrapie/Mastitis Milk	1,320	Cheviot	Yes	+/+	+/+	23
849 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie/Mastitis Milk	1,840	Cheviot	No	+/+	+/+	29
951 (ARQ/$ARQ_{wildtype}$)	Scrapie/Mastitis Milk	1,160	Cheviot	No	-	-	12
953 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie Milk	1,450	Cheviot	No	-	-	28
956 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie Milk	1,650	Cheviot	No	-	-	28
957 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie Milk	1,420	Cheviot	No	-	-	28
049 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie Brain 20%	25	Cheviot	No	+	+	23
958 (AL_{141}RQ/AF_{141}RQ)	Scrapie Brain 20%	25	Cheviot	No	+	+	23

AGNELLI ALIMENTATI CON LATTE DA PECORE CON SCRAPIE E MASTITE

AGNELLI ALIMENTATI CON LATTE DA PECORE CON SCRAPIE

Dosi infettanti nel latte di pecora con scrapie, Lacroux et al. 2008:

Bassa:	1.3 IC tg338 ID50/ml di latte
Alta:	40 IC tg338 ID50/ml di latte

$$\frac{\text{Quantità di latte infetto prodotto} \times \text{Dosi infettanti per litro di latte}}{\text{Quantità di latte prodotto}}$$

= dosi infettanti per litro di latte commercializzato (n =1)

Come rendere questa valutazione del rischio più comprensibile:

Bassa:	1.3 IC tg338 ID50/ml di latte
Alta:	40 IC tg338 ID50/ml di latte

CONSIDERATO CHE CIRCA 1.2 L DI LATTE INFETTA UN OVINO E CHE IN UN L DI LATTE CI SONO CIRCA 1300 DOSI INFETTANTI POSSIAMO DEDURRE CHE PER INFETTARE UN AGNELLO GLI SI DOVREBBE SOMMINISTRARE 1300 L DI LATTE COMMERCIALE NELLA MIGLIORE DELLE IPOTESI MENTRE NELLA PEGGIORE BASTEREBBERO CIRCA 32 L.

LE PUBBLICAZIONI DURANTE L'ATTIVITA' DI RICERCA UN SEGNO DI TRASPARENZA !

- PrPSc *deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie.*
(2006) Archives of Virology 51, 2007–2020

- *Intraepithelial and Interstitial Deposition of Pathological Prion Protein in Kidneys of Scrapie-Affected Sheep*.
(2007). PLoS ONE 2(9): e859. doi:10.1371/journal.pone.0000859

- *N176K and M137T dimorphisms of the PRNP gene significantly decrease the susceptibility to classical scrapie in ARQ/ARQ sheep.*
(2009) Animal Genetics, 40, 982-985

- Association of N176K and L141F dimorphisms of the PRNP gene with lack of pathological prion protein deposition in placentas of naturally and experimentally scrapie-affected ARQ/ARQ sheep.
(***2010) J Gen Virol. Sep;91(Pt 9):2402-7.***

- Sheep with scrapie and mastitis transmit infectious prions through the milk
(2010) J Virol in press

Grazie a tutti quelli che lavorano con me giorno dopo giorno nonostante… :

M Saba
G Cancedda
C Maestrale
C Santucciu
M G Tilocca
M Masia
M Pina Vargiu
P Melis
S Macciocu
B Ibba
A Lai
V Carta
S Denti
F Demontis
S Poddighe

Grazie a Prof. DiGuardo, Dr. Agrimi e Dr. Ru che tanto hanno contribuito a queste ricerche !!!!!!!