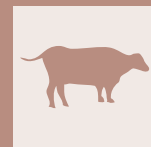


# Sorveglianza della BSE in Italia: aspetti neuropatologici in bovini clinicamente sospetti



B. IULINI<sup>1</sup>, C. MAURELLA<sup>1</sup>, A. D'ANGELO<sup>2</sup>, T. AVANZATO<sup>1</sup>, C.L. FLORIO<sup>1</sup>, C. BELLINO<sup>2</sup>, B. MANEA<sup>1</sup>, D. GELMETTI<sup>3</sup>, A. MARONI PONTI<sup>4</sup>, M. CARAMELLI<sup>1</sup>, C. CASALONE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie animali

<sup>2</sup> Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino - Dipartimento di Patologia Animale

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

<sup>4</sup> Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali

## RIASSUNTO

Dal 2001 sono stati riportati in Italia nell'ambito del sistema di sorveglianza passiva per la BSE 243 bovini sospetti clinici. Lo scopo del presente studio è quello di descrivere le diagnosi neuropatologiche effettuate tra il 2001 e il 2009 in bovini con sintomi nervosi ascrivibili a BSE e non confermati dagli esami istologico, immunoistochimico e Western Blot.

L'esame neuropatologico sull'intero Sistema Nervoso Centrale è stato effettuato su 230 animali. Inoltre in 100 soggetti a livello della corteccia frontale è stato eseguito l'esame immunoistochimico per la ricerca della PrP<sup>Sc</sup> al fine di escludere casi di BSE atipica.

Sono state evidenziate lesioni istologiche nel 36,9% dei casi e le diagnosi differenziali sono state classificate nei seguenti gruppi: meningo/encefaliti non suppurative, listeriosi, lesioni degenerative, meningo/encefaliti suppurative, neoplasie e malformazioni. Il 55,2% dei soggetti esaminati non mostrava lesioni neuropatologiche e il 7,9% è risultato non idoneo. È stato identificato un solo caso di BSE classica e nessun caso di BSE atipica.

Questo lavoro ha permesso di effettuare uno studio approfondito sulle malattie neuropatologiche del bovino e ha dimostrato che il sistema di sorveglianza è uno strumento fondamentale per il monitoraggio delle patologie neurologiche e per l'identificazione di eventuali casi di BSE.

## PAROLE CHIAVE

Encefalo, bovini, BSE, sistema di sorveglianza.

## INTRODUZIONE

L'Encefalopatia Spongiforme Bovina (BSE) è una malattia neurodegenerativa trasmissibile del bovino adulto a decorso progressivo ed esito fatale, caratterizzata clinicamente da alterazioni del comportamento e da incoordinazione dei movimenti ed istologicamente da vacuolizzazione neuronale e del neuropilo, reazione gliale e totale mancanza di lesioni infiammatorie<sup>19</sup>. Venne descritta per la prima volta nel Regno Unito nel 1986<sup>19</sup>, dove si è manifestata come epidemia di origine alimentare verosimilmente dovuta all'introduzione nella dieta dei bovini di farine di carne ed ossa contaminate da prioni.

La BSE appartiene al gruppo delle TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy), patologie caratterizzate dall'accumulo a livello cerebrale della PrP<sup>Sc</sup>, una isoforma patologica della Proteina Prionica Cellular e (PrP<sup>C</sup>), normalmente presente nei tessuti dell'ospite. Le TSE possono colpire diverse specie animali e l'uomo. Le forme umane includono la malattia di Creutzfeldt-Jakob (CJD), il Kuru e la sindrome di Gerstmann-Sträussler-Scheinker. Nel 1996 in UK è stata descritta per la prima volta una nuova forma di CJD chiamata "nuova variante CJD" (nv-CJD)<sup>20</sup>. Da quel mo-

mento in poi la BSE è passata dall'essere un problema di Sanità Animale ad uno di Sanità Pubblica, essendo una malattia a carattere zoonosico.

Durante l'epidemia della BSE, l'attività dei sistemi veterinari è risultata essere un'arma fondamentale per affrontare tale crisi. Attorno alla BSE è stato costruito un imponente sistema di sorveglianza che nel giro di pochi anni è riuscito sia a fornire dati per meglio conoscere le caratteristiche epidemiologiche della malattia sia, e in parte di conseguenza, a mettere in atto e monitorare le misure in grado di evitarne al minimo la diffusione all'interno del patrimonio bovino. La stabilità raggiunta dal sistema di sorveglianza nei confronti della minaccia BSE è costata un'enormità in termini non solo economici, ma soprattutto di energia umana e professionale.

Nel 1992 l'OIE ha proposto che lo stato sanitario di un paese nei confronti della BSE fosse valutato attraverso l'applicazione di un sistema costituito da tre componenti principali: valutazione del rischio, gestione del pericolo di introduzione della malattia e livello di incidenza. Quest'ultimo parametro doveva essere calcolato sulla base della registrazione dei casi clinici di BSE, confermati in seconda istanza dagli esami di laboratorio. L'inefficacia del sistema proposto nel 1992 si è manifestata nel 1999 in seguito all'adozione da parte della Svizzera dei test rapidi (sistema di sorveglianza attiva); di 50 casi di BSE registrati nell'anno, 25 sono stati identificati attraverso l'utilizzo del test e sarebbero per tanto sfuggiti alla

Autore per la corrispondenza:  
Barbara Iulini (barbara.iulini@izsto.it).

sola sorveglianza passiva (segnalazione degli animali recanti sintomatologia neurologica). Dopo di ciò, lo Scientific Steering Committee ha indicato nell'associazione tra sorveglianza passiva e sorveglianza attiva, lo strumento adatto a svelare il maggior numero possibile di casi di malattia. A partire da quel momento si è andati verso la costruzione del più imponente sistema di sorveglianza di una malattia che sia mai stato implementato. Nel 2001 sono stati adottati obbligatoriamente i test rapidi da tutti gli Stati Membri e si è scoperto che la BSE era presente, con incidenze variabili, in tutta Europa. Nonostante siano stati introdotti i test di laboratorio, la Commissione Europea ha continuato a sottolineare l'importanza dell'identificazione clinica dei casi di BSE. Il sistema di sorveglianza attiva ha infatti costi enormi e non può durare a lungo, esso infatti è un sistema di monitoraggio da utilizzarsi nelle fasi crescenti dell'epidemia ma che è destinato ad esaurirsi perché troppo oneroso.

A partire dal 2005 in Europa ha preso sempre più consistenza l'ipotesi della necessità di adeguare il sistema di sorveglianza della malattia alla sua nuova e più ottimistica situazione epidemiologica; attraverso un'uniforme e complesso sistema europeo di raccolta dati si è dimostrato il trend negativo dell'epidemia ed è altresì stata provata l'efficacia delle misure sanitarie intraprese<sup>4</sup>. Per queste motivazioni il principio di precauzione attuato fino a quel momento, decisamente oneroso, poteva trasformarsi in un più concreto e snello sistema di mantenimento delle misure che hanno provocato l'eliminazione dei fattori di rischio e di monitoraggio della situazione<sup>3</sup>. Tali proposte sono state raccolte in un documento chiamato "TSE road map" che prevede che nell'arco del decennio successivo vi siano due momenti principali di cambiamento: uno nel breve e medio periodo (2005-2009) e uno successivo a questo (2009-2014). I cambiamenti previsti sono tanti e vanno tutti nella stessa direzione: misure meno restrittive e sorveglianza mirata sulle popolazioni a rischio come a maggior rischio.

Al momento attuale non esistono test diagnostici disponibili per la diagnosi in vivo delle TSE, pertanto l'esame clinico rappresenta il primo passo fondamentale nella diagnosi della malattia.

Con l'introduzione inoltre del Regolamento 999/2001 tutti i casi clinicamente sospetti di BSE devono essere sottoposti per conferma ad esame istologico, immunocitochimico e immunobiochimico sul tronco encefalico; in caso di esito negativo il manuale dell'OIE prevede inoltre che l'intero encefalo di questi animali venga sottoposto ad ulteriori indagini al fine della formulazione di una diagnosi differenziale.

Lo studio neuropatologico dell'intero encefalo di animali con sintomi nervosi risulta pertanto essere un mezzo di indagine valido non soltanto nei casi negativi al test rapido ma anche in quelli in cui la patologia è stata confermata.

A tal proposito infatti, proprio nell'ambito di uno studio approfondito sulle caratteristiche neuropatologiche e molecolari dei casi italiani di BSE, nel 2004 è stata scoperta la prima variante atipica, denominata B<sub>AS</sub>E (Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy)<sup>7</sup>. Nel corso degli ultimi anni sono stati identificati anche in altri paesi europei casi atipici di BSE con caratteristiche molecolari della proteina prionica (PrP<sup>Sc</sup>) differenti da quelle della malattia nella sua forma classica. Nella B<sub>AS</sub>E si è evidenziata la presenza della PrP<sup>Sc</sup> prevalentemente nelle porzioni più rostrali dell'encefalo anziché nel tronco encefalico, maggiormente colpito in corso di BSE classica.

Nel presente studio sono stati esaminati encefali di bovini adulti pervenuti al CEA (Centro Encefalopatie Animali) come "sospetti clinici" nel periodo compreso tra gennaio 2001 e agosto 2009 nell'ambito del programma di sorveglianza passiva per BSE.

Tali campioni sono stati sottoposti ad ulteriori indagini al fine di evidenziare patologie neurologiche eventualmente presenti.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo gennaio 2001 - agosto 2009 sono stati riportati in Italia come sospetti clinici di BSE 243 bovini; nell'ambito del presente studio sono stati esaminati complessivamente 230 soggetti, di età compresa tra 1 e 17 anni, di entrambi i sessi e appartenenti a razze diverse.

Per ogni animale sono stati raccolti i dati clinici ed epidemiologici tramite una scheda formulata ad hoc ed inseriti in un database.

Gli encefali prelevati sono stati divisi in due parti con un taglio paramediano. La porzione di dimensioni maggiori è stata fissata in formalina tamponata al 10% per gli esami istologico ed immunocitochimico, la porzione rimanente è stata congelata a -20°C per le indagini microbiologiche.

Il tronco encefalico è stato diviso lungo il piano sagittale mediano. Una sezione è stata fissata in formalina al 10% e una sezione è stata congelata a -20°C.

Su tutti i campioni raccolti si è proceduto all'esecuzione degli esami istologico, immunocitochimico e Western Blot sul tronco encefalico per la ricerca della PrP<sup>Sc</sup>. Nel periodo in esame è stato evidenziato un unico caso di BSE. L'encefalo degli animali risultati negativi è stato sottoposto ad ulteriori indagini al fine di formulare una diagnosi differenziale. Sono state eseguite sezioni trasversali rappresentative delle diverse aree neuroanatomiche (telencefalo, diencefalo, mesencefalo, ponte, cervelletto, obex) e si è proceduto alla processazione, all'inclusione in paraffina e alla colorazione con Ematossilina - Eosina. Successivamente è stata eseguita una lettura di tutte le aree encefaliche per un dettagliato esame neuropatologico del Sistema Nervoso Centrale (SNC).

Nei quadri neuropatologici ascrivibili a listeriosi si è proceduto ad una indagine immunocitochimica per *Listeria* spp. con anticorpo policlonale di coniglio diluito 1:250 (Virostat, Portland, Maine) applicato overnight a 4°C (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories).

Al fine di escludere casi di BSE, sezioni di corteccia frontale sono state esaminate mediante indagine immunocitochimica (IHC) per la ricerca della PrP<sup>Sc</sup>. I campioni sono stati sottoposti dopo sparfinitura e idratazione, ad un pretrattamento con acido formico al 98% e ad autoclavaggio a 121°C; successivamente sono stati incubati a 4°C con l'anticorpo primario monoclonale F99/97.6.1 (1:10 000). Si è poi proceduto all'incubazione con avidina-biotina-perossidasi, alla reazione con il cromogeno 3-3' diaminobenzidina (DAB) ed alla controcolorazione con Emallume di Mayer.

## RISULTATI

I sintomi clinici riferiti dai veterinari e registrati sulla scheda, sono stati raggruppati in 6 categorie principali secondo la

**Tabella 1** - Principali sintomi e loro frequenza negli animali denunciati come sospetti.

Sintomi	Numero
Alterazioni della postura	209
Alterazioni del sensorio/temperamento	206
Alterazioni dell'andatura	170
Nervi cranici	47
Vacca a terra	21
Crisi convulsive	8

funzione nervosa coinvolta (Tab. 1). Nel caso in cui l'animale fosse a terra, ma senza alterazioni dello stato mentale è stato incluso nella categoria "Vacche a terra", secondo quanto riportato in letteratura per definire tale sindrome. Sono stati ricondotti alla categoria "Crisi Convulsive" i soggetti che oltre alla perdita di coscienza presentavano segni di pedalamo. Sono altresì stati considerati coinvolti i nervi cranici oltre che nel caso in cui direttamente dichiarati come anormali anche quando fosse registrata la presenza di rotazione della testa (head tilt).

I risultati dell'esame neuropatologico sull'intero encefalo degli animali oggetto di studio sono riportati schematicamente nel Grafico 1.

Sono state evidenziate lesioni istologiche nel 36,9% dei casi. Il 55,2% dei soggetti esaminati non mostrava lesioni neuropatologiche e il 7,9% è risultato non idoneo.

### Meningo/encefaliti non suppurative

In 29 animali il quadro neuropatologico era ascrivibile a meningo/encefalite non suppurativa. Sulla base della gravità del reperto istopatologico osservato, i casi analizzati sono stati suddivisi in tre gruppi:

- Lesioni di lieve entità
- Lesioni di moderata entità
- Lesioni di grave entità

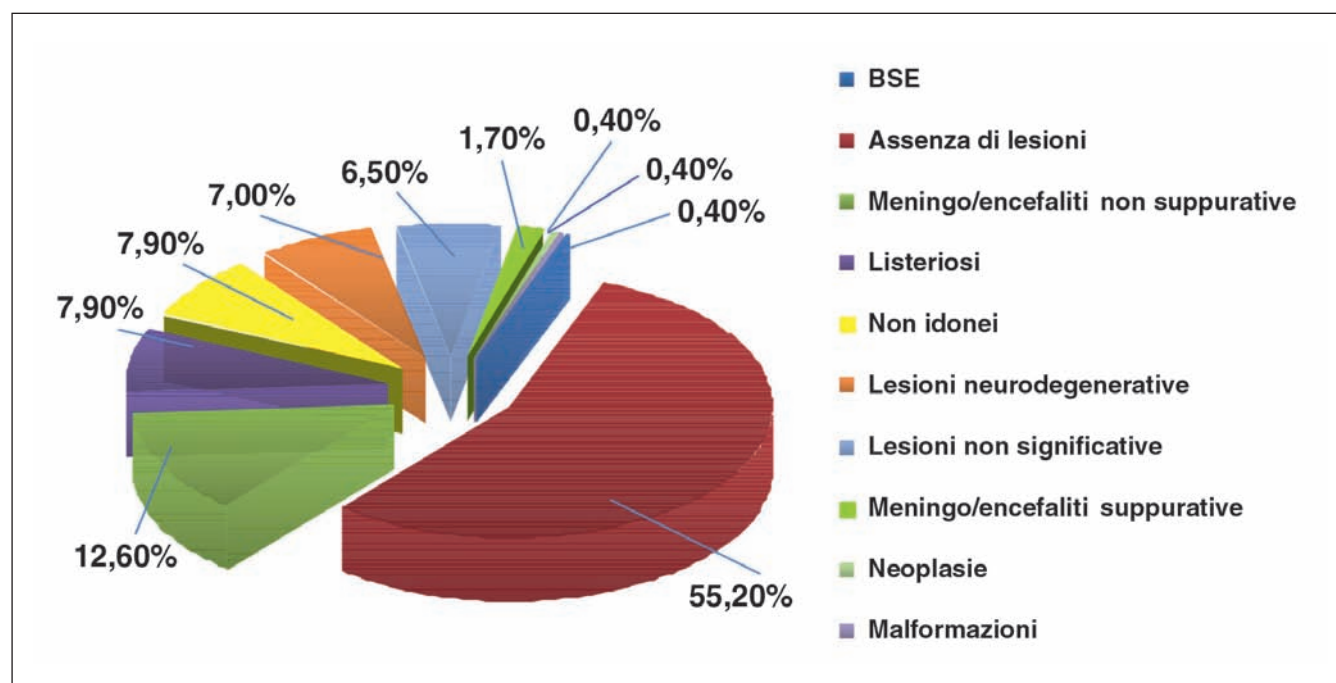
**Lesioni di lieve entità** - Tredici soggetti presentavano manicotti perivascolari costituiti da uno o due strati cellulari di natura prevalentemente linfocitaria. Tale lesione era apprezzabile in tutte le aree encefaliche ed era talora associata a modesta gliosi (Figura 1A).

**Lesioni di moderata entità** - In 12 casi il reperto istologico era caratterizzato dalla presenza di manicotti perivascolari costituiti da più strati cellulari di linfociti, istiociti e rare plasmacellule. Tali reperti si apprezzavano a carico di vasi di calibro variabile ed erano associati a fenomeni reattivi del tessuto nervoso con proliferazione gliale diffusa. Nel neuropilo si potevano osservare inoltre sofferenza neuronale, satellitosi e neurofagia. La sostanza grigia e la sostanza bianca risultavano uniformemente colpite in tutte le aree encefaliche (Figura 1B).

**Lesioni di grave entità** - Tre soggetti mostravano un quadro neuropatologico caratterizzato da evidenti manicotti perivascolari costituiti in proporzioni variabili da linfociti, istiociti, rare plasmacellule e rari macrofagi, e lo spazio perivasale appariva disteso da un essudato sierocellulare. Il tessuto nervoso circostante presentava fenomeni reattivi e evidenti con presenza di gliosi diffusa o di noduli gliali isolati nelle aree immediatamente adiacenti alle lesioni vascolari. A livello della sostanza grigia e in modo meno marcato nella sostanza bianca si osservava edema. In sede corticale erano evidenti fenomeni di necrosi neuronale, satellitosi e neurofagia; la degenerazione neuronale era inoltre molto marcata a livello dell'ippocampo. Le lesioni erano diffuse a tutte le aree encefaliche. A livello dello strato molecolare del cervelletto si apprezzava inoltre marcata gliosi.

Un quarto animale mostrava le lesioni neuropatologiche sopra descritte localizzate esclusivamente a livello del midollo allungato e del diencefalo (Figura 1C).

Dal punto di vista clinico solo il 55% dei soggetti con meningo/encefaliti non suppurative presentava una sintomatologia contraddistinta da deficit dell'andatura, della postura e del sensorio/temperamento.



**Grafico 1** - Lesioni neuropatologiche.

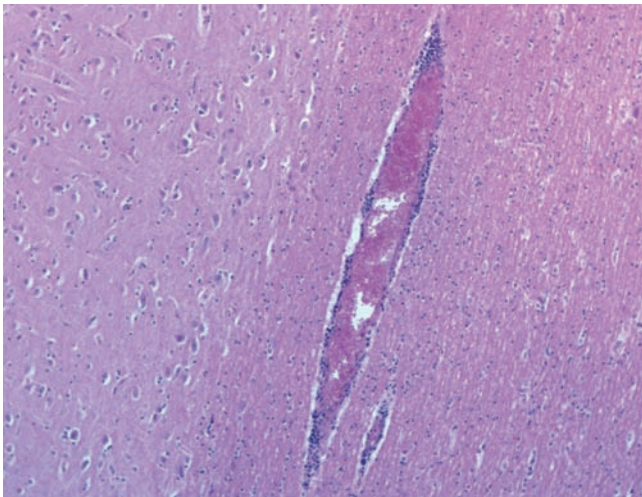


Figura 1A

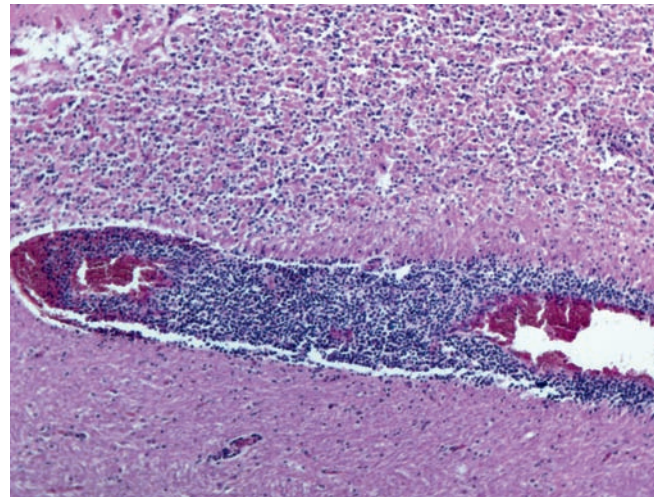


Figura 1C

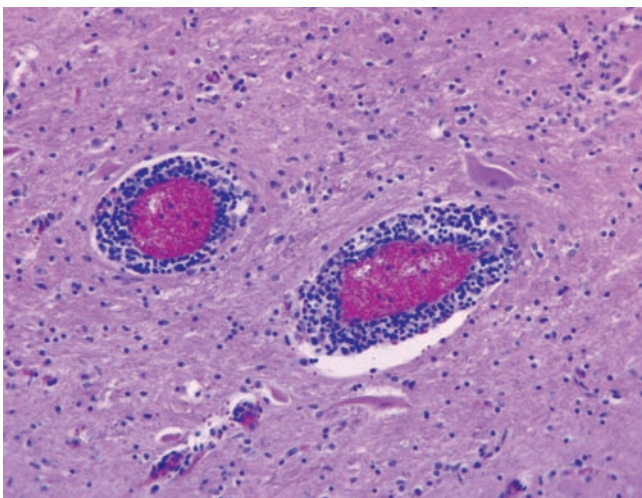


Figura 1B

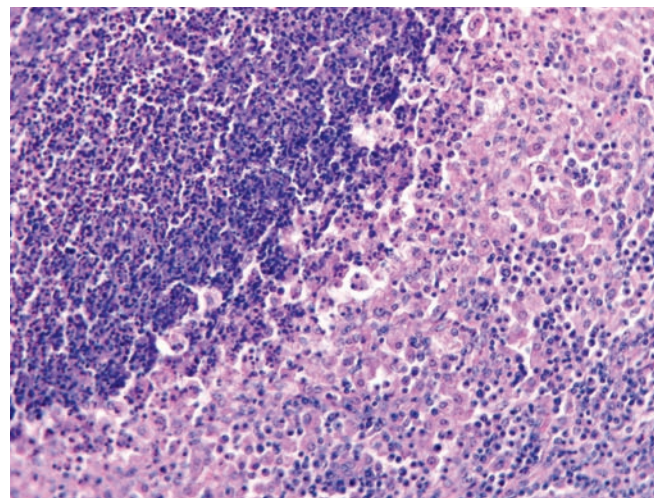


Figura 1D

**Figura 1 (A-B-C-D)** - Meningo/encefalite non suppurativa; **(A)** lesione di lieve entità: manicotto perivascular e costituito da due strati di cellule di natura linfocitaria (*Ematossilina-Eosina* 10x). **(B)** Lesione di modesta entità: manicotto perivascular costituito da più strati cellulari (*Ematossilina-Eosina* 20x). **(C)** Lesione grave: evidenti manicotti perivasculari costituiti da linfociti, istiociti, rare plasmacellule e macrofagi (*Ematossilina-Eosina* 10x). **(D)** Meningo/encefalite suppurativa: ascesso a livello del ponte (*Ematossilina-Eosina* 20x).

## Listeriosi

In 18 casi le lesioni erano ascrivibili a listeriosi. Il quadro istologico era caratterizzato dalla presenza di formazioni microascessuali disseminate associate a manicotti perivasculari di natura linfocitaria e linfo-istiocitaria. Le aree maggiormente colpite erano il mesencefalo e il tronco encefalico caudale. Un infiltrato mononucleare era in alcuni casi visibile anche a livello meningeo. L'esame immunocitochimico ha permesso di evidenziare l'antigene della *Listeria monocytogenes* nelle aree del SNC che presentavano microascessi e foci necrotici, principalmente all'interno del citoplasma dei macrofagi, talvolta in ambiente extracellulare. In pochi casi l'antigene è stato evidenziato a livello dei manicotti perivasculari (Figure 1G e 1H).

Clinicamente il 56% dei soggetti mostrava una sintomatologia neurologica contrassegnata da un coinvolgimento dei nervi cranici oltre alla presenza di alterazioni della postura, dell'andatura e del sensorio/temperamento.

## Lesioni neurodegenerative

In 14 soggetti i quadri istologici erano caratterizzati da edema, spongiosi focale o generalizzata della sostanza bianca,

gliosi, sofferenza neuronale, proliferazione vascolare di intensità variabile. La spongiosità della sostanza bianca presentava una distribuzione bilaterale simmetrica. Tali lesioni erano diffusamente distribuite nel telencefalo, diencefalo, cervelletto e midollo allungato con intensità variabile. Un solo soggetto su 14 rivelava all'esame istologico una intensa spongiosità bilaterale simmetrica a livello della sostanza bianca e nelle aree di transizione tra sostanza bianca e grigia. A livello della corteccia cerebrale erano inoltre presenti cellule di Alzheimer di II tipo riunite in piccoli gruppi. Le lesioni osservate in questi campioni erano compatibili con una patologia di tipo tossico-metabolico.

In altri 2 encefali il quadro istologico era invece ascrivibile a polioencefalomalacia. All'esame neuropatologico si osservava uno stato spongioso con interessamento prevalentemente laminare della sostanza grigia della corteccia e delle aree immediatamente adiacenti alla sostanza bianca. Tali lesioni interessavano in modo simmetrico e bilaterale la corteccia frontale e parietale. I fenomeni degenerativo-necrotici delle cellule nervose erano evidenti a livello dello strato corticale. La sofferenza neuronale in questa sede era espressa da pericario coarta-

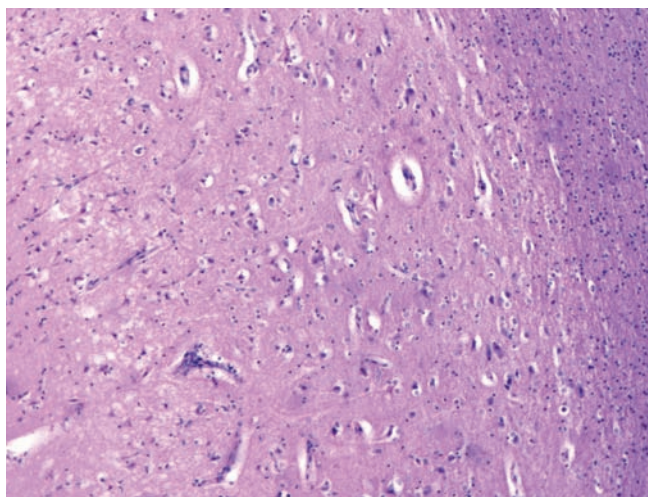


Figura 1E

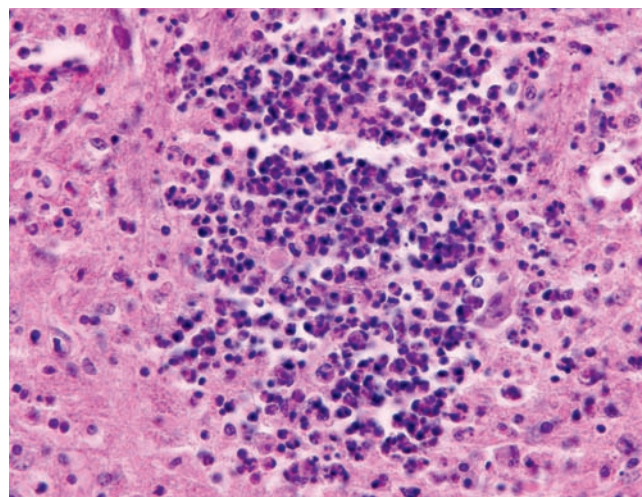


Figura 1G

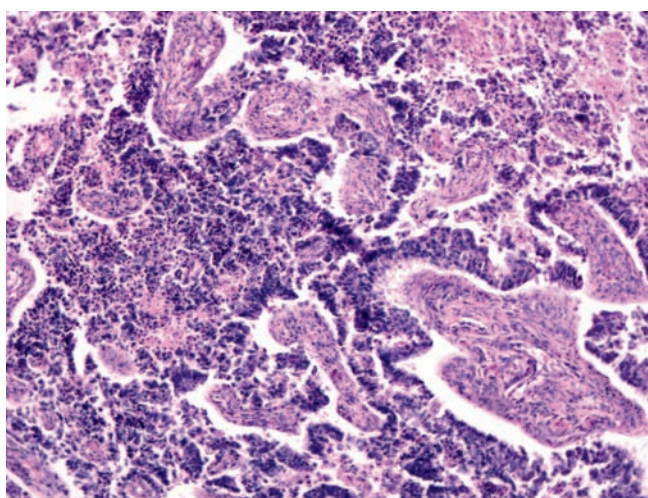


Figura 1F

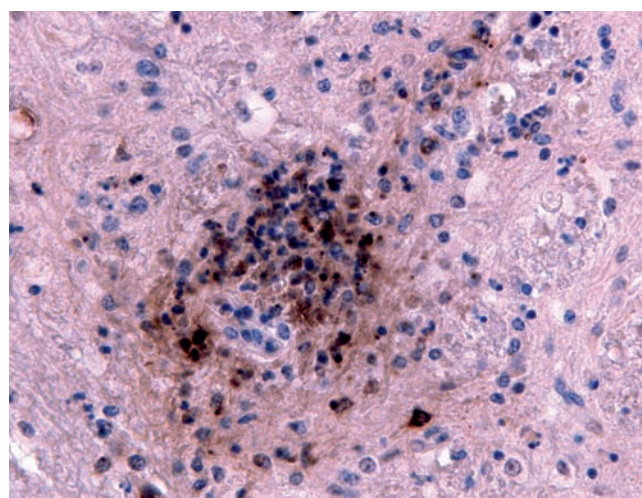


Figura 1H

**Figura 1 (E-F-G-H)** - (E) Lesione degenerativa: necrosi cerebro-corticale a livello della corteccia fr ontale (*Ematossilina-Eosina* 10x). (F) Neoplasia: carcinoma dei plessi corioidei (*Ematossilina-Eosina* 10x). (G) Listeriosi: formazione microascessuale associata a infiltrati linfo-monocitari (*Ematossilina-Eosina* 40x). (H) Listeriosi: evidenziazione dell'antigene *L. monocytogenes* all'interno di un microascesso (*Immunoistochimica* 40x).

to, citoplasma eosinofilo e nucleo picnotico. Erano inoltre presenti ipertrofia ed iperplasia degli elementi endoteliali delle pareti vasali di intensità variabile. Il quadro era riferibile a necrosi cerebro-corticale da carenza di tiamina (Figura 1E). Dal punto di vista clinico il 50% degli animali con lesioni neurodegenerative presentava deficit dell'andatura, della postura e del sensorio/temperamento.

### Lesioni non significative

In 15 casi le lesioni osservate erano ascrivibili a reperti di astrocitosi e manicotti perivasali di modica entità presenti non in tutte le aree encefaliche esaminate. Clinicamente questi soggetti mostravano una sintomatologia neurologica seppur lieve.

### Meningo/encefaliti suppurative

In 4 animali il quadro neuropatologico era riferibile a meningo/encefalite suppurativa. In due di questi il quadro istopatologico rivelava piccoli focolai ascessuali multipli disseminati in tutto il parenchima cerebrale; nel terzo animale a livello encefalico si osservava un nodulo ascessuale isolato con centro necrotico e capsula fibrosa dovuta a una reazione

fibroblastica del tessuto circostante. All'esterno di tale area era visibile astrocitosi e un infiltrato perivasale a carattere granulocitario. Il quarto soggetto mostrava una lesione microascessuale a livello del mesencefalo associata a foci emorragici e a manicotti perivascolari di tipo linfo-istiocitario con presenza di eosinofili nelle aree immediatamente adiacenti e a livello dell'obex (Figura 1D).

La maggior parte dei soggetti esaminati (3 su 4) presentava clinicamente deficit dell'andatura, della postura e del sensorio/temperamento.

### Malformazioni

In un bovino era macroscopicamente evidente una ipoplasia cerebellare. All'esame istologico si evidenziavano perdita delle cellule del Purkinje, rarefazione dello strato dei granuli e demielinizzazione a carico della sostanza bianca degli emisferi cerebellari.

### Neoplasie

In un solo soggetto è stata evidenziata una lesione neoplastica. Il quadro istopatologico ha rilevato la presenza di un car-

cinoma dei plessi corioidei. A tale livello si apprezzava una perdita della struttura papillare, presenza di atipie cellulari, aumento dell'indice mitotico e caratteri di invasività locale (Figura 1F).

### Campioni non idonei

Gli encefali di 18 animali segnalati come "sospetti clinici" sono risultati non idonei in quanto tali campioni si presentavano in condizioni di avanzata autolisi o con artefatti da congelamento.

L'esame immunostochimico per l'evidenziazione della PrP<sup>Sc</sup> è stato eseguito sulla corteccia frontale di 100 soggetti, risultati tutti negativi. Sugli altri campioni non è stato possibile effettuare l'indagine in quanto in alcuni non era presente l'area target e altri si presentavano in stato di avanzata autolisi.

## DISCUSSIONE

Il presente studio ha permesso di analizzare e approfondire le conoscenze sulle principali lesioni neuropatologiche riscontrate a livello del sistema nervoso centrale di bovini con sintomatologia nervosa, per venire al CEA nell'ambito del programma di sorveglianza avviato in Italia nel periodo 2001-2009.

I risultati ottenuti in questo lavoro sono sovrapponibili a quelli descritti precedentemente da altri autori<sup>6,12,14</sup> nel corso di indagini condotte su animali adulti sospetti di BSE e non confermati.

Nel 55,2% dei casi analizzati l'encefalo appariva nella norma, mentre lesioni "non significative" sono state riscontrate a livello cerebrale nel 6,5% dei casi di bovini con sintomatologia nervosa. Questo dato concorda sostanzialmente con quanto riportato in letteratura<sup>6,14</sup>. La presenza di una grossa percentuale di bovini che all'esame neuropatologico non presentavano lesioni può essere spiegata dal fatto che spesso alcune sindromi del bovino quali la cetoacidemia, l'ipomagnesemia e l'avvelenamento acuto da piombo, pur dando sintomatologia neurologica, non provocano alterazioni a livello encefalico<sup>12</sup>.

Nel corso delle indagini cliniche è stata inoltre riportata una sintomatologia neurologica in soggetti con patologie che non coinvolgevano il SNC come ad esempio traumi agli arti, problemi chirurgici (dislocazione dell'abomaso, sindrome da corpo estraneo e problemi circolatori), metriti, mastiti e ritenzioni placentari. Queste patologie infatti possono provocare una sintomatologia algica con aumento della reattività agli stimoli, sensorio depresso e difficoltà nella deambulazione.

La meningo/encefalite non suppurativa e la listeriosi rappresentavano i reperti più frequentemente descritti nei campioni osservati nel periodo di studio. Le meningo/encefaliti non suppurative sono state riscontrate nel 12,6% dei casi osservati e la classificazione è stata fatta sulla base delle caratteristiche morfologiche della lesione a prescindere dall'agente eziologico. In tre casi inseriti in questa categoria è stato osservato un quadro neuropatologico ascrivibile ad encefalite sporadica con distribuzione e localizzazione delle lesioni sovrapponibili a quanto riportato in bibliografia<sup>18</sup>. La malattia è stata riportata per la prima volta in Svizzera come condizione frequente nei bovini adulti, dove evolve in forma subacuta o cronica ad insorgenza sporadica; l'eziologia di questa patologia non è stata ancora definitivamente chiarita<sup>18</sup>.

La listeriosi è stata osservata nel 7,9% dei casi. In letteratura è riportato come *Listeria monocytogenes* risultato presente in animali sintomatici risultati negativi per BSE nel 20% dei casi in Germania<sup>15</sup>, in Inghilterra nell'8%<sup>14</sup>, in Scozia nell'11%<sup>12</sup> e in Danimarca nel 36%<sup>1</sup>. Questi risultati sottolineano l'importanza della listeriosi nella diagnosi differenziale per la BSE.

Solo nell'1,7% dei soggetti sono state osservate lesioni di tipo suppurativo ma non è stato possibile eseguirle e indagini colturali al fine di identificare l'agente eziologico a causa della mancanza di tessuto congelato. Gli accessi cerebrali del bovino sono riportati in animali giovani e adulti e possono derivare da metastasi batteriche ematogene o dalla estensione di una lesione focale; tuttavia tale patologia è una condizione relativamente infrequente in questa specie<sup>2</sup>. Gli agenti eziologici isolati da ascessi encefalici nel bovino e maggiormente descritti sono *E. coli* e *Arcanobacterium pyogenes*.

Lesioni a carattere degenerativo sono state osservate nel 7% dei casi. In 14 campioni tali lesioni erano attribuite a disordini tossico-metabolici. Il quadro istologico variava da lievi fenomeni degenerativi legati a uno stato ipossico dell'encefalo a manifestazioni più gravi associate a sofferenza neuronale e spongiosi diffusa. La patogenesi di queste lesioni non è stata definitivamente chiarita, ma questi reperti potrebbero essere attribuiti a disordini metabolici o encefalopatie di origine renale o epatica. In base a quanto riportato in letteratura, in questi disordini, la degenerazione spongiforme presente a livello della sostanza bianca è spesso associata alla demielinizzazione delle fibre nervose<sup>17</sup>. Le cause ipotizzate sono generalmente di natura congenita, tossica o metabolica. Lo shunt porto-sistemico congenito rappresenta la più comune causa di encefalomielopatia in cani e gatti anziani, mentre nei grossi animali tale patologia è spesso associata a condizioni epatotossiche<sup>5,9</sup>. Un riscontro frequente nelle encefalopatie di origine epatica è la presenza delle cellule di Alzheimer di tipo II disposte in piccoli gruppi o isolate negli strati profondi della corteccia cerebrale. Nell'uomo e nel cavallo tale reperto orienta verso una diagnosi di encefalopatia epatica o di iperammoniemia<sup>17</sup>. Nel presente studio la presenza di questi tipi di cellule è stata evidenziata soltanto in un encefalo.

In due campioni inseriti nel gruppo delle lesioni degenerative, è stata invece descritta una polioencefalomalacia e le lesioni erano ascrivibili ad una carenza di tiamina. Tale sindrome carenziale è stata ampiamente descritta in passato come una delle cause di malattia a sintomatologia nervosa più frequenti negli allevamenti intensivi di giovani animali (vitelli e vitelloni da 4 a 8 mesi) alimentati con insilati e mangime<sup>8</sup>. Nel soggetto adulto l'incidenza della patologia è minore e la carenza di tiamina può essere la conseguenza della somministrazione di mangimi ad alto contenuto di solfati che riducono il flusso duodenale di tiamina. Il solfito, intermedio della riduzione del solfato, scinde infatti la tiamina riducendone la biodisponibilità.

La letteratura riporta episodi di polioencefalomalacia in bovini adulti ai quali era stata somministrata acqua di bevanda contenente quantità eccessive di sodio solfato<sup>11</sup>. Quando la polioencefalomalacia si possono osservare infine nell'avvelenamento acuto da piombo, nell'intossicazione acuta da cloruro di sodio/privazione di acqua<sup>14</sup>. Più recentemente è stata dimostrata l'associazione tra l'Herpesvirus bovino di tipo 5 (BHV-5) e la necrosi cerebro-corticale<sup>16</sup>; nel nostro lavoro non è stata evidenziata nessuna correlazione.

Nel presente studio è stato evidenziato un caso di ipoplasia cerebellare in una bovina di quattro anni di razza friulana. L'animale presentava iper eccitabilità agli stimoli, nervosismo, salivazione, tremori della testa, opistotono, atassia ed ipermetria dei quattro arti. L'età di comparsa dei sintomi, l'anamnesi e la sintomatologia clinica potevano far sospettare un caso di BSE. Le lesioni cerebrali erano limitate al cervelletto ed erano più evidenti negli emisferi cerebellari di quanto lo fossero nel verme. Sulla base di quanto riportato in bibliografia il virus della BVD può causare ipoplasia cerebellare in seguito ad infezione uterina e al momento della nascita dare segni clinici di danno cerebellare che non peggiorano con l'età; nel nostro caso però non è stata evidenziata nessuna correlazione<sup>10</sup>.

L'unica neoplasia osservata negli animali oggetto di studio era rappresentata dal carcinoma dei plessi corioidei in un bovino di quattro anni. All'esame clinico l'animale presentava movimenti di maneggio e testa deviata, scialorrea, ipotonicità generalizzata e infine decubito permanente. I tumori dei plessi corioidei sono neoplasie rare che derivano dall'epitelio dei plessi corioidei e sono state descritte raramente in cane, gatto, cavallo e bovino. La recente Classificazione Internazionale WHO dei Tumori del Sistema Nervoso degli Animali Domestici propone inoltre come criterio diagnostico di Carcinoma dei Plessi Corioidei l'invasione e le metastasi del nevrasso.

Dall'indagine immunohistochimica per la ricerca della PrP<sup>Sc</sup> non è stato evidenziato nessun caso di BASE nei nostri campioni. Nella BASE la deposizione di proteina prionica patologica è caratterizzata dalla formazione di placche amiloidi Kuru simili e depositi granulari a livello extracellulare e gliale. Accertato che la presenza della PrP<sup>Sc</sup> si riscontra prevalentemente nelle porzioni più rostrali dell'encefalo, correlate al sistema olfattivo, si ipotizza una via di diffusione dell'agente diversa da quella alimentare. Tuttavia, a meno che l'agente patogeno non si propaghi attraverso le vie olfattorie o altre vie nervose periferiche, è possibile che tale patologia rappresenti una forma sporadica di BSE del bovino<sup>7</sup>.

Un dato clinico di notevole interesse emerso durante gli studi di infezione sperimentale della BASE nei bovini, dimostra che tale patologia si manifesta con una sintomatologia pressoché silente, e i pochi segni clinici rilevati (dimagrimento, lievi disturbi comportamentali) non sono comunque riconducibili ai sintomi caratteristici della BSE<sup>13</sup>. La blanda sintomatologia riferita potrebbe non essere facilmente riconoscibile e passare pericolosamente inosservata.

Una percentuale ancora elevata (7,9%) di campioni non idonei all'esame neuropatologico conferma la necessità di una formazione costante agli operatori sulle corrette modalità del prelievo, conservazione ed in via del materiale da sottoporre ad indagine. Un esame istopatologico su materiale idoneo è infatti fondamentale al fine di formulare una corretta diagnosi morfologica ed eziologica e per tanto sia l'esame istologico sia l'esame immunohistochimico sono indispensabili per una efficace sorveglianza sugli animali sintomatici.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha permesso di effettuare un monitoraggio approfondito sulle malattie neuropatologiche del bovino adulto anche se ulteriori studi sono senz'altro necessari al fine

di approfondire le conoscenze nel campo della neuropatologia bovina.

In conclusione si può affermare che l'attività di sorveglianza passiva riveste un ruolo di primaria importanza nella diagnosi di patologie neurologiche, oltre ad essere strumento indispensabile nell'identificazione di eventuali casi di BSE.

## RINGRAZIAMENTI

Il lavoro è stato effettuato nell'ambito dei seguenti Progetti di Ricerca: Ricerca Corrente IZSPLV 14/06 e Progetto di sorveglianza "Una nuova strategia per affrontare le TSE in Italia" finanziati dal Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali.

Si ringrazia la Sig. Cristiana Corci per la gestione del database "sospetti clinici di BSE" del CEA.

## Surveillance of BSE in Italy: neuropathological findings in clinically suspected cases

### SUMMARY

Since 2001 in the frame of the passive surveillance for Bovine Spongiform Encephalopathy 243 clinical suspects were reported in Italy.

The purpose of this study was to review the neuropathological diagnoses obtained in the period 2001-2009 in cattle displaying clinical signs consistent with BSE and not confirmed by histological, immunohistochemical and Western Blot investigations.

Neuropathological observations were made in 230 animals and the whole Central Nervous System (CNS) of each animal was examined by histology. Moreover, immunohistochemistry for PrP<sup>Sc</sup> at the level of frontal cortex was carried out in 100 animals in order to exclude the occurrence of atypical BSE.

Neuropathological findings were detected in 36.9% cases and the differential diagnoses were classified as: non-suppurative meningo/encephalitis, listeriosis, degenerative diseases, suppurative meningo/encephalitis, neoplasia, malformations. No histological lesions were found in 55.2% of the samples tested and the unsuitable ones were 7.9%. One case of BSE was detected but no case of atypical BSE was observed.

This study has identified diseases and lesions that are encountered in the differential diagnosis of BSE and it has demonstrated that the surveillance system is a necessary tool in order to monitor neuropathological diseases and to discover of BSE cases.

### KEY WORDS

Brain, bovine, BSE, surveillance system.

## Bibliografia

1. Agerholm J.S., Tegtmeier C.L., Nielsen T.K. (2002) Survey of laboratory findings in suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Denmark from 1990 to 2000. *APMIS* 110: 54-60.
2. El-Khodery S., Yamada K., Aoki D., Kamio K., Kishimoto M., Shimizu J., Kobayashi Y., Ishii M., Inokuma H., Yamauchi S., Matsui T. (2008) Brain Abscess in a Japanese Black Calf: Utility of Computed Tomography (CT). *J Vet Med Sci* 70 (7): 727-730.

- Benedictus A., Hogeveen H., Berends B.R. (2009) The price of the precautionary principle: cost-effectiveness of BSE intervention strategies in The Netherlands. *Prev Vet Med* 1; 89 (3-4): 212-22.
- Budka H., Goossens B., Ru G. (2008) BSE and TSEs: Past, present and future. *Trends in food science & Technology*.
- Café Marçal V., Oevermann A., Bley T., Pfister P., Mielard J. (2008) Hepatic encephalomyelopathy in a calf with congenital portosystemic shunt (CPSS). *J Vet Sci* 9 (1): 113-115.
- Caramelli M., Ru G., Bozzetta E., Casalone C., Di Francesco G., Di Guardo G., Di Sarno A., Gelmetti D., Ligios C., Mutinelli F., Troiano P. (2000) Sorveglianza della BSE: diagnosi differenziali in bovini con sintomatologia neurologica. *Large Animals Review*, 3: 17-23.
- Casalone C., Zanusso G., Acutis P., Ferrari S., Capucci L., Tagliavini F., Monaco S., Caramelli M. (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. Mar 2; 101(9):3065-70.
- Cravero G.C. (1983) *Lezioni di anatomia patologica veterinaria generale e speciale* Ed. ECIG.
- D'Angelo A., Bellino C., Alborali G.L., Biancardi A., Borrelli A., Capucchio M.T., Catalano D., Dellaferera G., Maurella C., Cagnasso A. (2007) Neurological signs associated with aflatoxicosis in Piedmontese calves. *Vet Rec*. May 19; 160(20):698-700.
- D'Angelo A., Cravero G.C., Crescio M.I., Iulini B., Maurella C., Casalone C. (2008) Cerebellar hypoplasia in a clinically suspected but unconfirmed case of BSE in a cow. *Vet Rec*. May 10; 162(19):627-8.
- Hamlen H., Clark E., Janzen E. (1993) Polioencephalomalacia in cattle consuming water with elevated sodium sulfate levels: A herd investigation. *Can Vet J*. 1993 Mar; 34(3): 153-158.
- Jeffrey M. (1992) A Neuropathological survey of brain submitted under the Bovine Spongiform Encephalopathy Orders in Scotland. *Vet Rec* 10: 131, 332-337.
- Lombardi G., Casalone C., D'Angelo A., Gelmetti D., Torcoli G., Barbieri I., Corona C., Fasoli E., Farinazzo A., Fiorini M., Gelati M., Iulini B., Tagliavini F., Ferrari S., Caramelli M., Monaco S., Capucci L. and Zanusso G. (2008) Intraspecific transmission of BSE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *Plos. Path.* May 23; 4 (5).
- McGill I.S., Wells G.A.H. (1993) Neuropathological Findings in Cattle with Clinically Suspected but Histologically Unconfirmed Bovine Spongiform Encephalopathy. *J. Comp. Path.* 108: 241-260.
- Miyashita M., Stierstorfer B., Schmahl W. (2004) Neuropathological Findings in Brains of Bavarian Cattle Clinically Suspected of Bovine Spongiform Encephalopathy. *J. Vet Med* 51: 209-215.
- Pérez S.E., Vagnozzi A., Sur J.H., Odrizola E., Campero C.M., Odeón A.C. (2003) Retrospective analysis of cases with a diagnosis of cerebrocortical necrosis and its relation with type 5 bovine herpesvirus. *Rev Argent Microbiol*. 2003 Apr-Jun; 35 (2): 69-73.
- Summer B. A., Cummings J. F., de Lahunta A. (1995) Metabolic and circulatory disorders In: *Veterinary Neuropathology Mosby-Year Book*, St Louis, MO.
- Theil D., Fatzer R., Schiller I., Caplazi P., Zurbriggen A., Vandeveld M. (1998) Neuropathological and aetiological studies of sporadic non-suppurative meningoencephalomyelitis of cattle. *Vet Rec* 143: 244-249.
- Wells G.A., Scott A.C., Johnson C.T., Gunning R.F., Hancock R.D., Jeffrey M., Dawson M., Bradley R. (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121: 419-420.
- Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousins S.N., Estibeiro K., Alpevitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., Smith P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt Jacob disease in UK. *Lancet*, 347: 921-925.

## LINEE GUIDA PER LA PUBBLICAZIONE SU LARGE ANIMAL REVIEW

Large Animal Review è una rivista bimestrale pubblicata da SIVAR per l'aggiornamento scientifico dei veterinari che si occupano di animali da reddito, con particolare riferimento ai bovini, suini e ovicaprini, ma anche ad altre specie (avicolicole, ittiche e animali selvatici) e al controllo di filiera nella produzione degli alimenti di origine animale. Gli argomenti di principale interesse per la rivista sono quelli dell'intervento veterinario clinico-terapeutico, chirurgico e di prevenzione, compreso i sistemi di indagine e gestione sanitaria degli allevamenti, le problematiche di alimentazione con effetti sullo stato sanitario degli animali allevati e gli interventi veterinari sulla filiera di produzione degli alimenti con un approccio del tipo "dall'allevamento alla tavola / dalla tavola all'allevamento". I contributi devono possedere il necessario rigore scientifico ed un contenuto pratico-applicativo al fine di portare informazioni immediatamente utilizzabili da parte del veterinario pratico, principale destinatario della divulgazione. In questa ottica è auspicabile che fra gli autori compaiano veterinari pratici (liberi professionisti, dipendenti ASL o dell'industria) accanto a esponenti del mondo universitario, degli Istituti Zooprofilattici o di altri enti di ricerca.

### CONTRIBUTI

Large Animal Review pubblica contributi sotto forma di review, di articoli originali anche in forma breve e di lettere. Salvo accordi particolari con la redazione i contributi devono rispettare le caratteristiche sottoindicate.

**Review** - Sono trattazioni complete di un argomento specifico accompagnate da una esauriente ed aggiornata bibliografia. Generalmente sono richieste dall'editore a studiosi di riconosciuta competenza della materia. Il testo non deve superare i 48.000 caratteri circa (spazi inclusi) ed essere accompagnato da non più di 15 tra figure e tabelle.

**Articoli** - Sono contributi originali in forma estesa o breve, che riportano casistiche, esperienze cliniche, terapeutiche e diagnostiche, metodologie di studio, indagini di laboratorio, metodologie di allevamento, nutrizionistiche e di gestione sanitaria degli allevamenti, ecc., che presentino elementi di novità ed interesse scientifico. Il testo dell'articolo esteso non deve superare i 32.000 caratteri (spazi inclusi) ed essere accompagnato da non più di 10 tra figure e tabelle. Sono graditi i contributi in forma di articolo breve di un massimo di 16000 caratteri e non oltre 4 tra figure e tabelle.

**Lettere** - Sono contributi molto brevi, utilizzabili in linea di massima per comunicazioni preliminari e non devono superare i 4000 caratteri (spazi inclusi), più una o due tra figure e tabelle.

### FORMATO

Tutti i lavori devono presentare la seguente struttura:

**TITOLO** - Il titolo del lavoro, in italiano e in inglese, breve ed esplicativo deve essere redatto sulla prima pagina insieme a nome e cognome degli Autori, ente di appartenenza o tipo di attività svolta, recapito, numero di telefono ed indirizzo e-mail del primo autore.

**PAROLE CHIAVE e RIASSUNTO** - Un massimo di 5 parole chiave vanno riportate sulla seconda pagina seguita da un riassunto, che deve avere dimensioni comprese tra 1500 e 1800 caratteri (spazi inclusi), deve essere suddiviso in scopo del lavoro, risultati e conclusioni e deve riportare i contenuti in modo conciso ma chiaro; parole chiave e riassunto devono essere tradotti in lingua inglese.

**CORPO del TESTO** - I manoscritti degli **articoli originali** devono presentare il seguente schema: introduzione, materiali e metodi, risultati, discussione, conclusioni, ringraziamenti e bibliografia. Le **lettere** pur seguendo lo schema degli articoli originali possono essere scritte in forma narrativa senza capitoli. Nel caso delle **review** non è previsto uno schema guida ma l'argomento deve essere trattato in modo completo e suddiviso in capitoli per renderlo il più chiaro possibile.

Il testo va redatto con carattere Times New Roman 12 punti, margini laterali, superiore e inferiore di 2 centimetri, interlinea singola e non deve superare il numero di caratteri (spazi inclusi) indicato nel paragrafo precedente per ciascun tipo di contributo.

**TABELLE E FIGURE** - Le tabelle e le figure (grafici disegni ed immagini) sempre richiamate nel testo, devono essere con numeri arabi e corredate da titoli o didascalie concisi ma sufficientemente dettagliati, in modo che risultino comprensibili senza dovere fare riferimento al testo. Tabelle e figure, salvo diversi accordi presi con la redazione o casi particolari (es. documentazioni fotografiche) devono essere e nel numero massimo indicato nel paragrafo precedente.

**BIBLIOGRAFIA** - Le referenze bibliografiche ritenute essenziali (possibilmente non oltre 15 ad eccezione delle review) devono essere richiamate nel testo con un numero progressivo fra parentesi ed elencate nello stesso ordine numerico nella bibliografia.

Per gli articoli tratti da riviste si dovranno indicare: cognome e iniziale del nome dell'autore e dei Coautori, anno di pubblicazione, titolo dell'articolo, indicazione abbreviata della rivista (in accordo all'*Index Medicus*), numero del volume, numero della pagina iniziale e finale.

Per citazioni bibliografiche di articoli o capitoli contenuti nei libri di testo, si dovranno indicare: cognome e iniziale del no-

me dell'Autore e dei Coautori, anno di pubblicazione, titolo del capitolo, titolo del libro, numero del volume (se più volumi), editori, edizione, pagina iniziale e finale del capitolo, casa editrice e sua sede.

Si riportano due referenze a titolo di esempio:

- Galey F.D., Terra R., Walker R., Adaska J., Eichebarne M.A., Puschner B., Fisher E., Whitlock R.H., Rocke T., Willoughby D., Tor E. (2000) Type C botulism in dairy cattle from feed contaminated with a dead cat. *J Vet Diagn Invest*, 12: 204-209.
- Gustafson D.P. (1986) Pseudorabies. In: *Diseases of swine*, Ed. Dunn H.W., 5th ed., 274-289, Iowa State University Press, Ames, IA.

### VALUTAZIONE

Tutti i lavori ritenuti conformi alle linee guida sopra descritte verranno sottoposti al giudizio di lettori esperti per una valutazione dell'interesse pratico e della validità scientifica. I pareri saranno riassunti in una scheda di lettura inviata al primo autore del lavoro, tramite la quale potranno essere richieste precisazioni o modifiche. La redazione si riserva comunque il diritto di accettare o meno un lavoro e l'eventuale data di pubblicazione. I lavori rinviati agli autori con richieste di modifiche dovranno essere corretti e restituiti entro 30 giorni. Le bozze di stampa saranno inviate al primo Autore se non diversamente richiesto. Le bozze corrette dovranno essere inviate alla Redazione della rivista entro sette giorni dalla ricezione. Le correzioni dovranno essere limitate agli errori tipografici e non dovranno alterare la lunghezza del testo. In ogni caso i materiali inviati non verranno restituiti.

### ESTRATTI DEGLI ARTICOLI

L'editore provvede a stampare ed inviare al primo autore 50 copie degli estratti dell'articolo. Un numero superiore di copie potrà essere richiesto a pagamento o unitamente all'invio delle bozze di stampa corrette.

### INVIO

Il contributo deve essere inviato esclusivamente in formato elettronico con file di testo in Microsoft Word (Mac o Windows) e immagini di buona qualità, nei formati JPEG, GIF, EPS e TIFF. Il tutto su floppy disk, CD-Rom o direttamente via email come allegati. Il materiale va in viatico a: Segreteria SIVAR, Palazzo Trecchi, Via Trecchi 20, 26100 CREMONA. Per informazioni: Paola Orioli - Tel. 0372 403539, email: [info@sivarnet.it](mailto:info@sivarnet.it).