

INDAGINI PATOGENETICHE SUI PLESSI DEL SISTEMA NERVOSO ENTERICO DI OVINI DI RAZZA SARDA INFETTATI PER OS CON L'AGENTE DELLA SCRAPIE E CON DIVERSA SUSCETTIBILITA' GENETICA NEI CONFRONTI DELLA MALATTIA *

Marruchella Giuseppe¹, Malatesta Daniela¹, Petrucci Luigi¹, Lalatta Costerbosa Giovanna², Clavanzani Paolo², Chiochetti Roberto², Mazzoni Maurizio², Albanese Valeria², Agrimi Umberto³, D'Agostino Claudia³, Vaccari Gabriele³, Nonno Romolo³, De Grossi Luigi⁴, Rosone Francesca⁴, Giordani Francesco⁴, Ligios Ciriaco⁵, Sarli Giuseppe⁶, Di Guardo Giovanni¹

¹Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Scienze Biomediche Compare, Teramo; ²Università degli Studi di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Morfofisiologia Veterinaria e Produzioni Animali, Ozzano Emilia (Bologna); ³Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Roma; ⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Viterbo; ⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari; ⁶Università degli Studi di Bologna, Facoltà di Medicina Veterinaria, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Ozzano Emilia (Bologna).

Sebbene il sistema nervoso enterico (ENS) svolga un ruolo cruciale nella scrapie ovina, non vi sono dati sulle popolazioni cellulari coinvolte nell'infezione, né sugli eventuali danni da esse subiti.

Il presente studio è stato condotto sui plessi mienterici e sottomucosi dell'ileo di 32 pecore di razza Sarda, recanti diversi genotipi (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR) con riferimento al gene codificante per la PrP^{Sc}. I suddetti animali, infettati *per os* all'età di 8 mesi con un ceppo di scrapie caratterizzato nel topo, sono stati sacrificati mediante eutanasia a determinati intervalli di tempo dall'infezione (p.i.). E' stata quindi valutata, tramite immunoistochimica ed immunofluorescenza indiretta su sezioni tissutali e su preparati "wholemout", l'immunoreattività (IR) nei confronti della PrP^{Sc}, del "marker" pan-neuronale Hu C/D, dell'ossido-nitrico sintetasi (nNOS), della calbindina (CALB), della proteina fibrillare acida gliale (GFAP) e della sinaptofisina.

In 8 pecore con genotipo ARQ/ARQ, clinicamente sane e sacrificate a 12-24 mesi p.i., nonché in 4 ovini clinicamente affetti (1 con genotipo ARQ/ARQ, 3 con genotipo ARQ/AHQ), questi ultimi sacrificati rispettivamente a 24, 35, 36,3 e 39,5 mesi p.i., le indagini immunoistochimiche hanno rivelato la presenza di PrP^{Sc} sia nell'encefalo (*obex*), sia nell'ENS, specialmente nei plessi mienterici. In tali distretti il deposito della PrP^{Sc} era compatibile con un interessamento delle cellule enterogliali (EGCs), mentre in 6 animali con genotipo ARQ/ARQ era evidente un drastico calo numerico ($P < 0,05$) dei neuroni CALB-IR rispetto ai soggetti di controllo ed a quelli con differente genotipo infettati *per os*. Inoltre, i neuroni CALB-IR mostravano una pressoché esclusiva IR nucleare.

I nostri dati supportano un coinvolgimento delle EGCs e dei neuroni CALB-IR dei plessi nervosi ileali nella scrapie ovina.

Parole chiave: Scrapie sperimentale, sistema nervoso enterico, ovino

PATHOGENETIC INVESTIGATIONS ON THE ENTERIC NERVOUS SYSTEM PLEXUSES OF SARDA BREED SHEEP WITH DIFFERENT PrP GENOTYPES FOLLOWING ORAL EXPERIMENTAL SCRAPIE INFECTION

The enteric nervous system (ENS) plays a key role in sheep scrapie, but no information exists on the cytotypes which are involved during infection, nor on the damage of such cells.

We investigated the ileal myenteric (MPs) and submucosal plexuses (SMPs) of 32 Sarda breed sheep carrying different PrP genotypes (ARQ/ARQ, ARQ/AHQ, ARQ/ARR, ARR/ARR), which had been orally dosed with scrapie at 8 months of age and euthanized at definite time intervals post-infection (p.i.). PrP^{Sc} immunoreactivity (IR), along with neuronal marker Hu C/D, nitric oxide synthase (nNOS), calbindin (CALB), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and synaptophysin IR, were evaluated by immunohistochemistry (IHC) and indirect immunofluorescence on paraffin sections and *wholemout* preparations.

Eight clinically-healthy ARQ/ARQ sheep euthanized at 12-24 months p.i., along with 1 ARQ/ARQ (euthanized at 24 months p.i.) and 3 ARQ/AHQ (euthanized at 35, 36.3 and 39.5 months p.i., respectively) clinically-affected sheep, showed IHC evidence of PrP^{Sc} in both their brain (*obex*) and ENS, especially in MPs. PrP^{Sc} deposition

was compatible with an involvement of enteroglial cells (EGCs) and a dramatic reduction (P value < 0.05) of CALB-IR neurons was observed in the MPs of 6 ARQ/ARQ animals, as compared to normal healthy controls and to infected subjects of different PrP genotypes, which also showed an almost exclusive nuclear IR of these cells.

Therefore, EGCs and CALB-IR neurons of ileal ENS plexuses are likely involved in sheep scrapie.

Keywords: Experimental scrapie, enteric nervous system, sheep