



istituto zooprofilattico sperimentale
del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

**XXI Convegno degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sulle
Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili**

TRASMISSIONE DELLA BASE PER VIA ORALE NELLA SPECIE CAPRINA

Cristiano Corona

SS.Neurobiologia Sperimentale

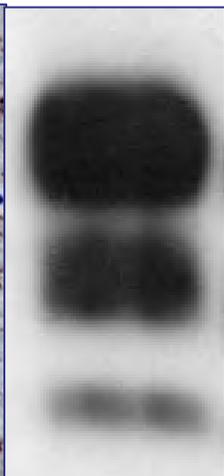
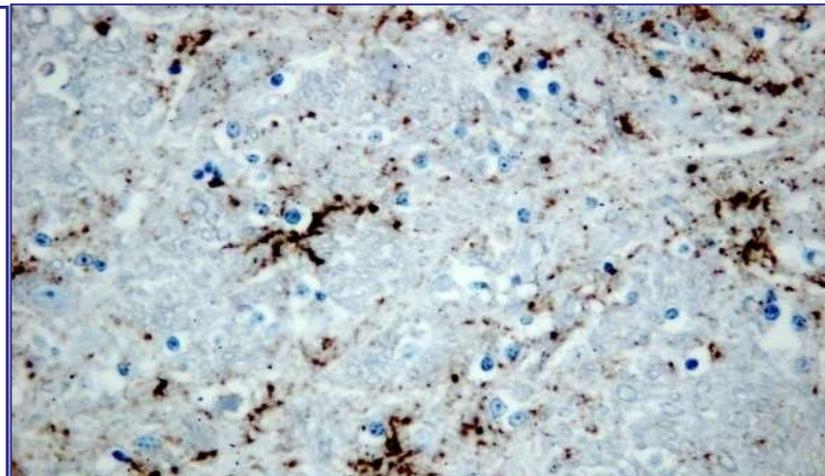
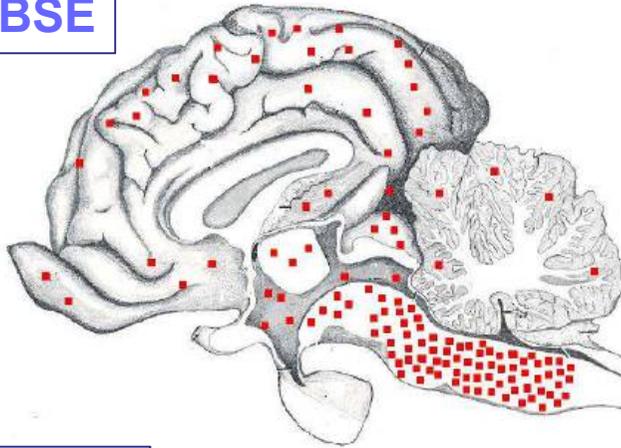
Torino 27 Gennaio 2022

Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease

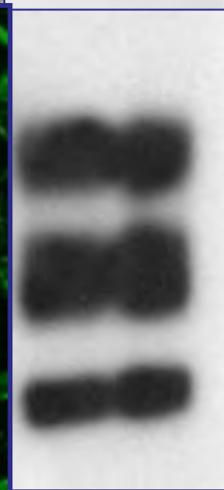
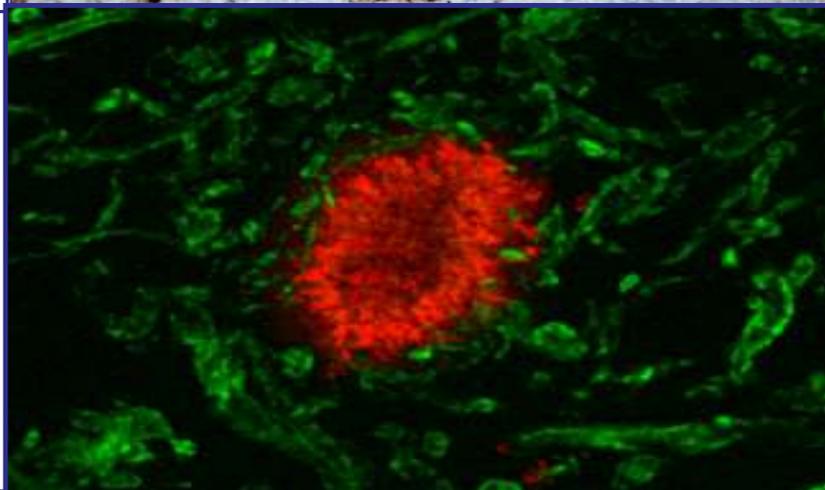
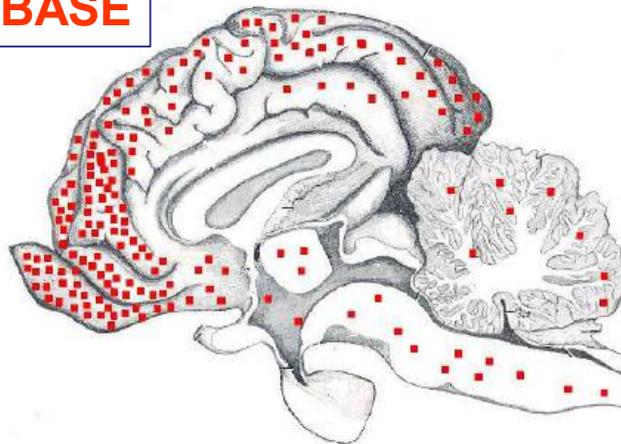
PNAS

Cristina Casalone^{*†}, Gianluigi Zanusso^{†‡}, Pierluigi Acutis^{*}, Sergio Ferrari[‡], Lorenzo Capucci[§], Fabrizio Tagliavini[¶], Salvatore Monaco[¶], and Maria Caramelli^{*}

BSE



BASE



Caratterizzazione del ceppo



Dal 2004, la **BASE**
inoculata in:



TgBov	L-type
TgOv	L-type/ C-BSE
TgHu.	L-type/ n.t.
Tga20	n.t.
C57BL/6	L-type
SJL	L-type
VM	L-type
RIII	C-BSE
Wild type ICR	n.t.

Studi di trasmissione sperimentale: risultati principali

Conversione del ceppo

Maggiore aggressività

Maggiore rischio per l'uomo

BSE negli ovicaprini



Casi naturali di cBSE negli ovicaprini

Non sono riportati casi naturali di infezione da cBSE nella pecora



BSE agent signatures in a goat

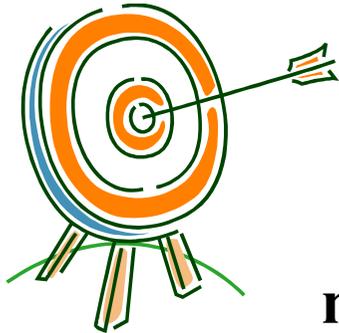
Marc Eloït, Karim Adjou, Muriel Culpier, Jean Jacques Fontaine, Rodolphe Hamel, Thomas Lilin, Sébastien Messiaen, UMR 1161 INRA/AFSSA/ENVA, 7 avenue de Général de Gaulle, 94704 Maisons Alfort, France

Isolation of Prion with BSE Properties from Farmed Goat

John Spiropoulos, Richard Lockey, Rosemary E. Sallis, Linda A. Terry, Leigh Thorne, Thomas M. Holder, Katy E. Beck, and Marion M. Simmons

L-type BSE

Trasmissione Sperimentale nella pecora
(Nonno 2008, Matsuura 2013, Simmons 2016)



Scopo dello studio

Caratterizzare il fenotipo clinico, patologico e molecolare della cBSE e della L-type BSE (BASE) nella specie caprina



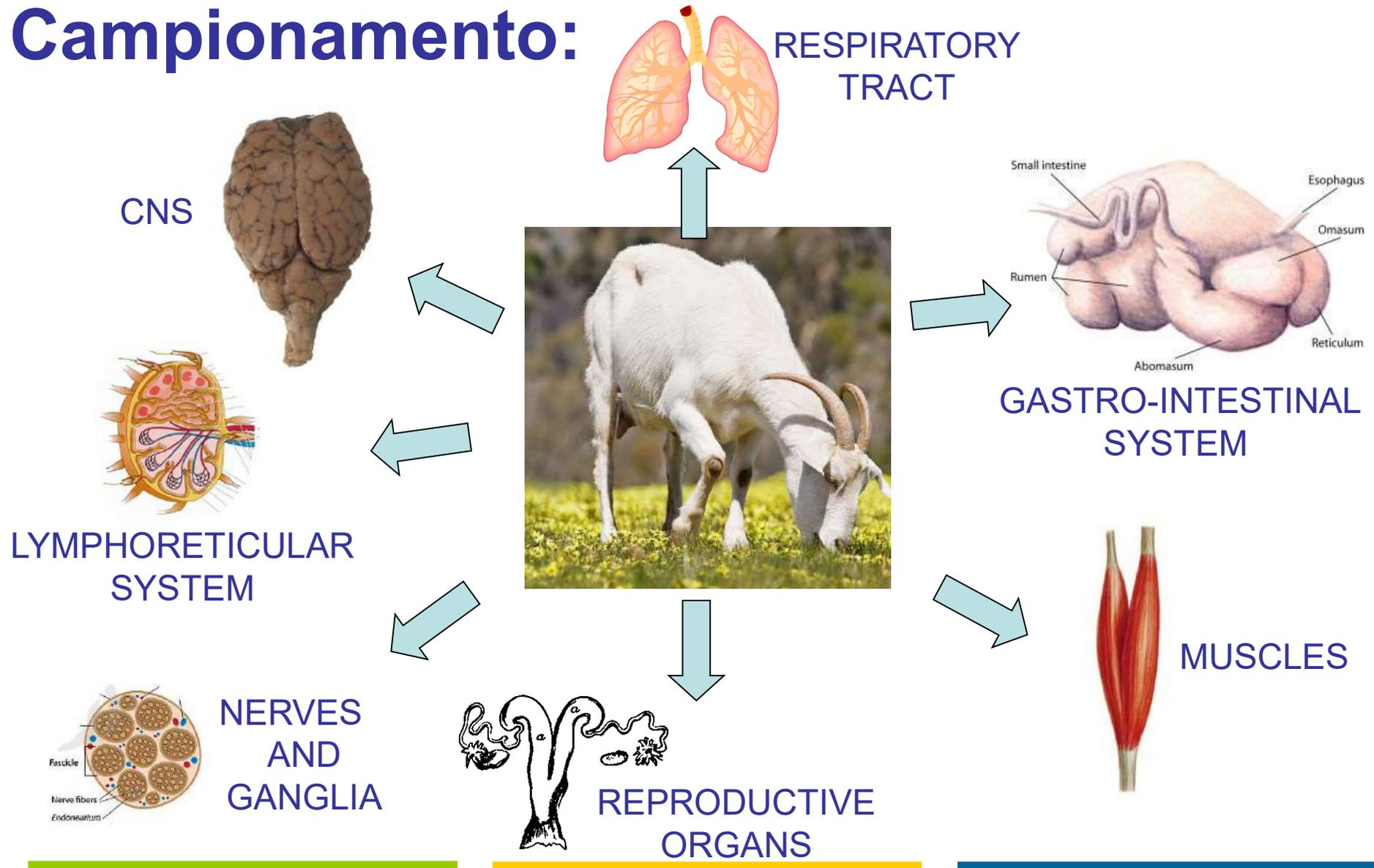
Disegno sperimentale:

	BSE i.c.	BASE i.c.	BASE os
N. Capre	5 + 1 ctrl	6 + 2 ctrl	5 + 1 ctrl
Data di inoculo	Settembre 2011	Settembre 2011	Settembre 2011
Inoculo	0,5 ml 10%	0,5 ml 10%	20 ml 30%
Tipo inoculo	IT 89109	IT 141387	IT 141387
Genotipo	Wild type	Wild type	Wild type
Età all'inoculo	6-7 mesi	6-7 mesi	6 mesi

Monitoraggio mensile :

- ❖ Esame clinico neurologico
- ❖ Prelievo di sangue
- ❖ Prelievo di urina
- ❖ Prelievo di saliva
- ❖ Prelievo di liquor

Campionamento:



CAPRE - Risultati:

	BSE i.c.	BASE i.c.	BASE os
IP ± SD (dpi)	568,25 (± 30,72)	1081,33 (± 321,57)	2370 (79 mesi circa)
AR ± SD	4/4	6/6	0/6
SV ± SD (dpi)	624,5 (± 28,36)	1239 (± 283,93)	-
Sintomi principali	Stato mentale alterato Lesioni cutanee Nervi cranici e reazioni posturali alterate Nibble positivo	Stato mentale alterato Lesioni cutanee Lievi deficit dei nervi cranici Tremori Nibble positivo	-

Vallino Costassa E., Plos One 2018
Favole A., BMC Research Notes 2021

Test rapido IDEXX HerdChek Antigen kit

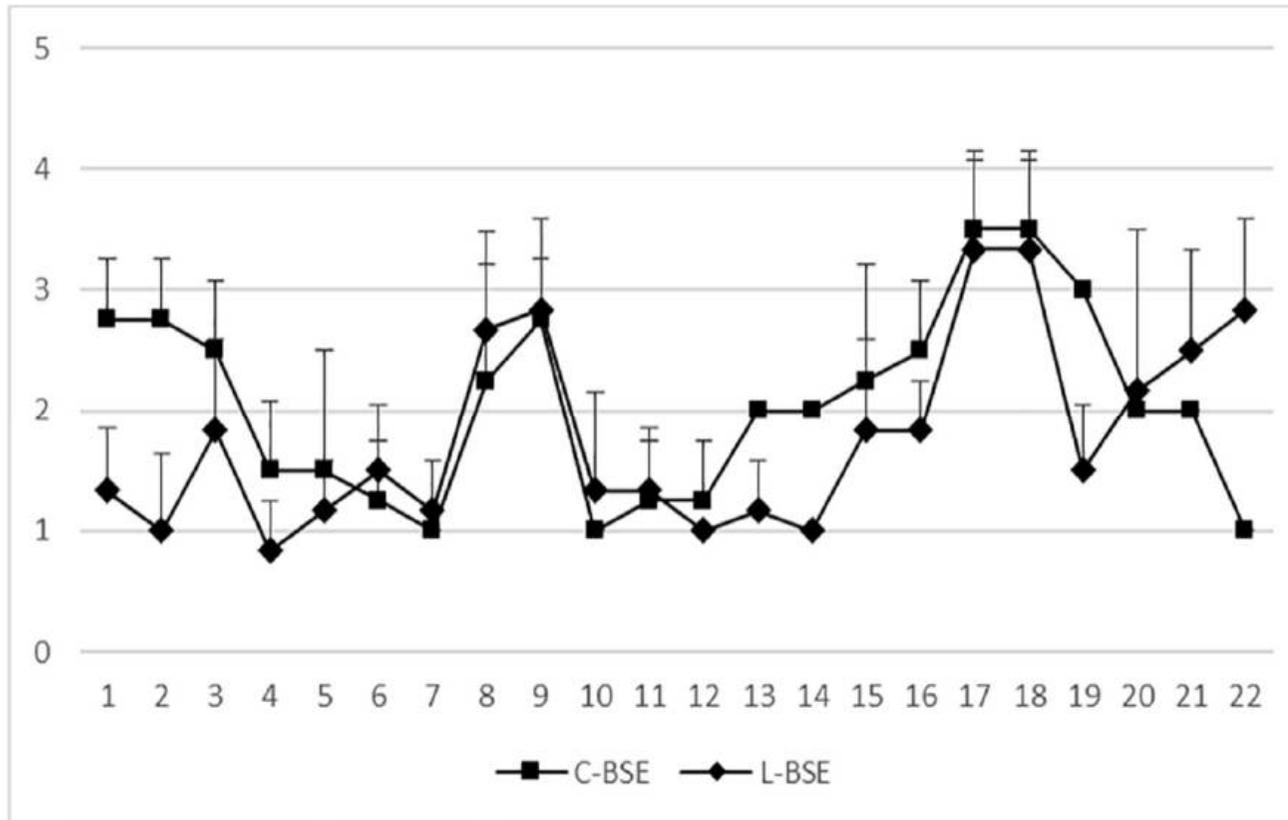
BSE i.c.

ID	DO
69556:	3.999
69557:	3.999
81553:	3.999
81556:	3.999
81559:	3.999
69538:	0.033C-

BASE i.c.

ID	DO
69548:	3.999
81554:	3.999
81557:	3.999
81560:	3.294
69540:	3.999
81563:	0.040C-

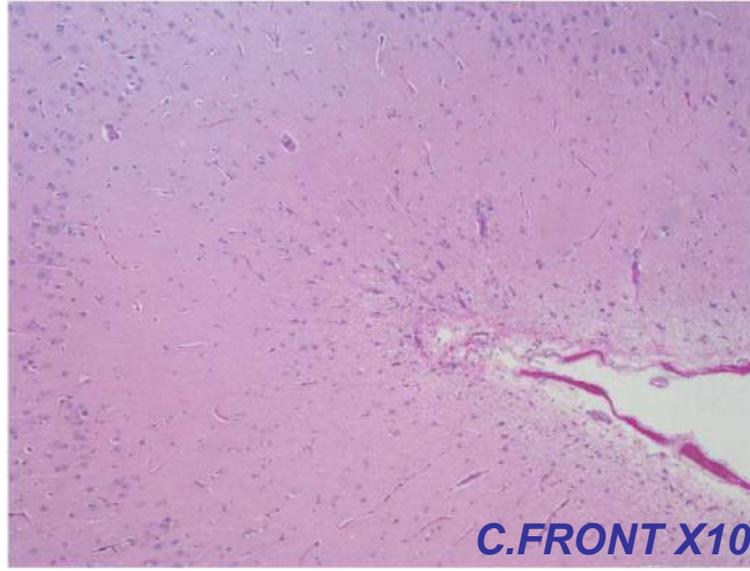
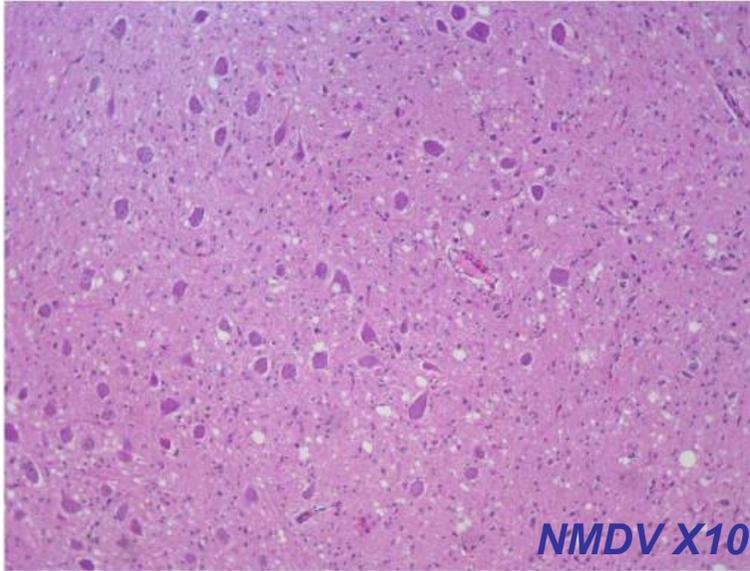
Lesion profiles:



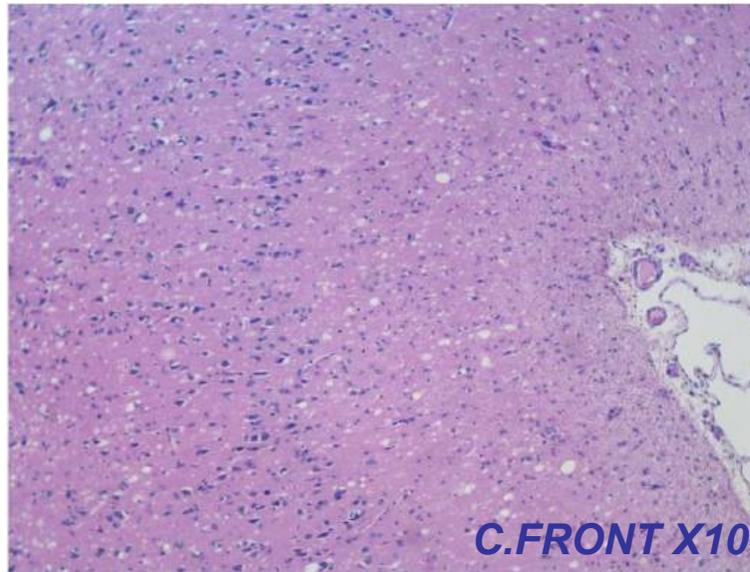
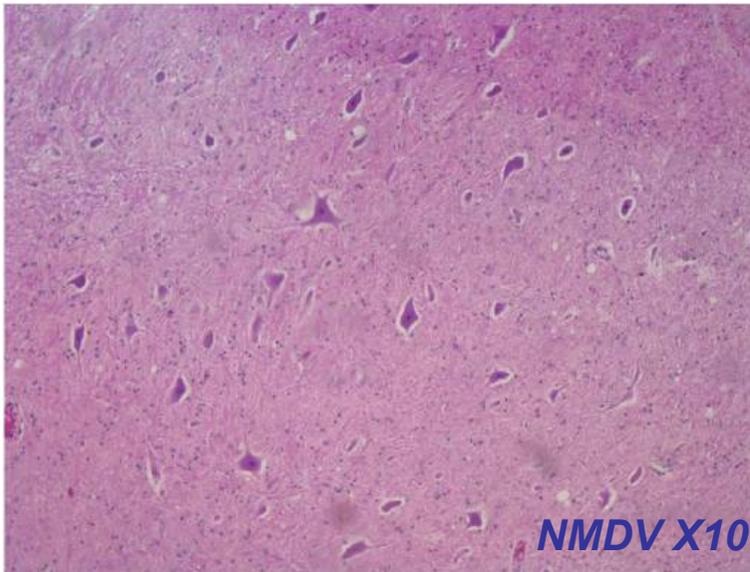
Brainstem - DMV	1
Brainstem - N.of the hypoglossal	2
Brainstem - Olfactory nuclei	3
Brainstem - N. trigeminal nerve	4
Brainstem - Cuneate N.	5
Brainstem - Reticular formation	6
Dorsal Medulla	7
Ventral Medulla	8
Pons - Vestibular nuclear c.	9
Cerebellum - Granular I.	10
Cerebellum - Molecular I.	11
Midbrain - Grey matter	12
Midbrain - Superior colliculus	13
Midbrain - Substantia nigra	14
Midbrain - Peduncles	15
Diencephalon - Cortex	16
Diencephalon - Hypothalamus	17
Diencephalon - Thalamus	18
Diencephalon - Hippocampus	19
Telencephalon - Frontal cortex	20
Telencephalon - Caudate N.	21
Telencephalon - Nucleus accumbens	22
Telencephalon - Putamen	23



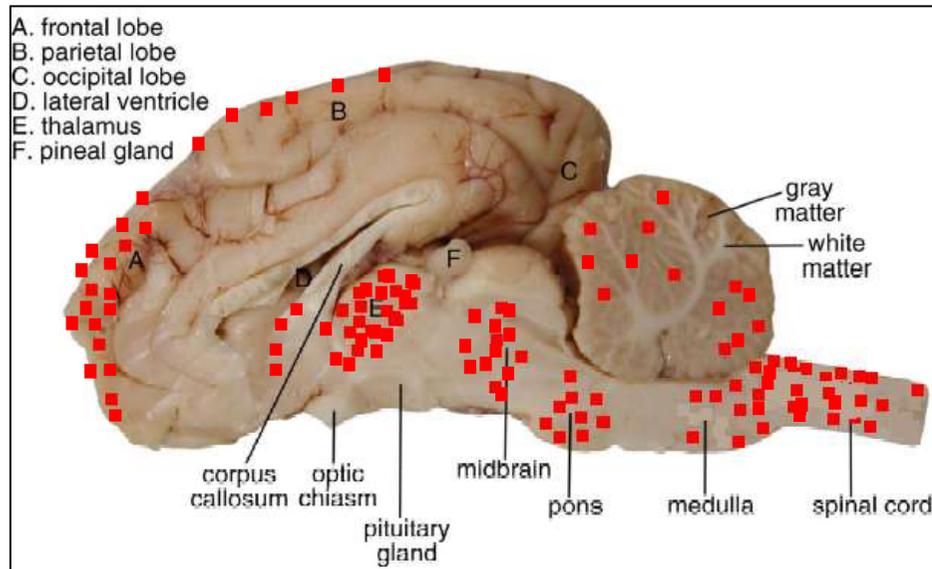
BSE i.c.



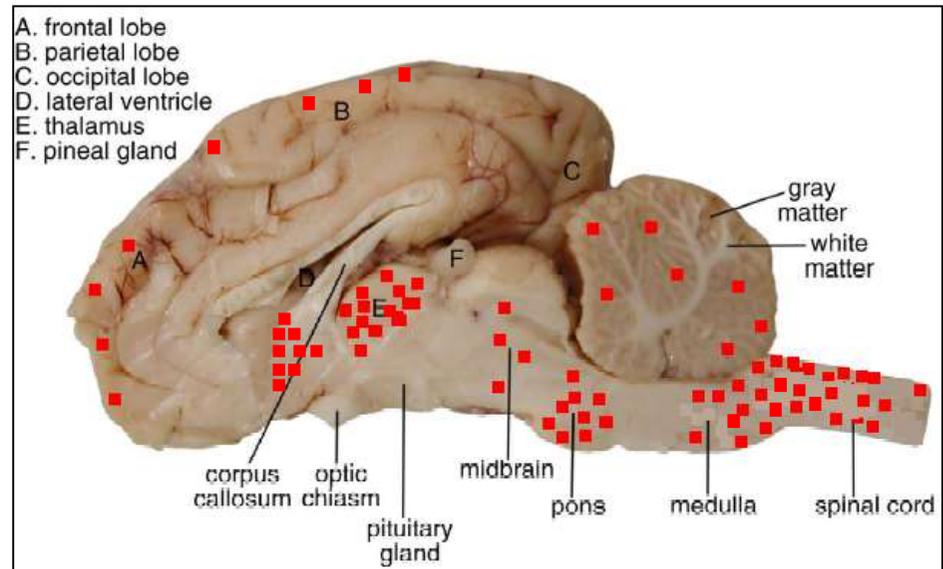
BASE i.c.



Distribuzione della PrPSc:



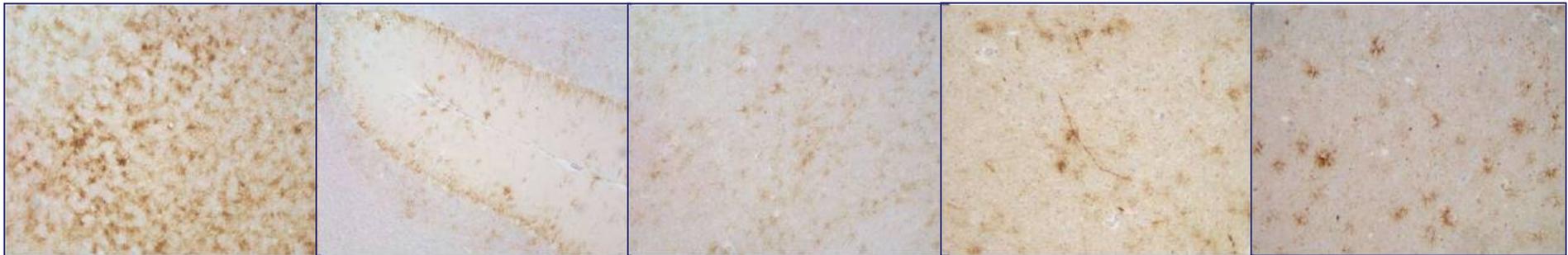
BSE i.c.



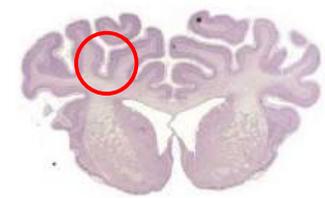
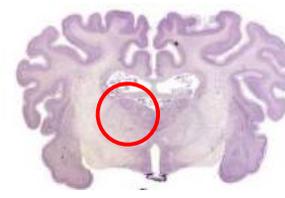
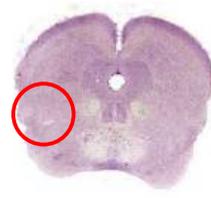
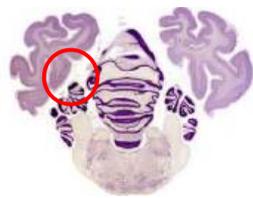
BASE i.c.

Patterns di deposizione della PrPSc

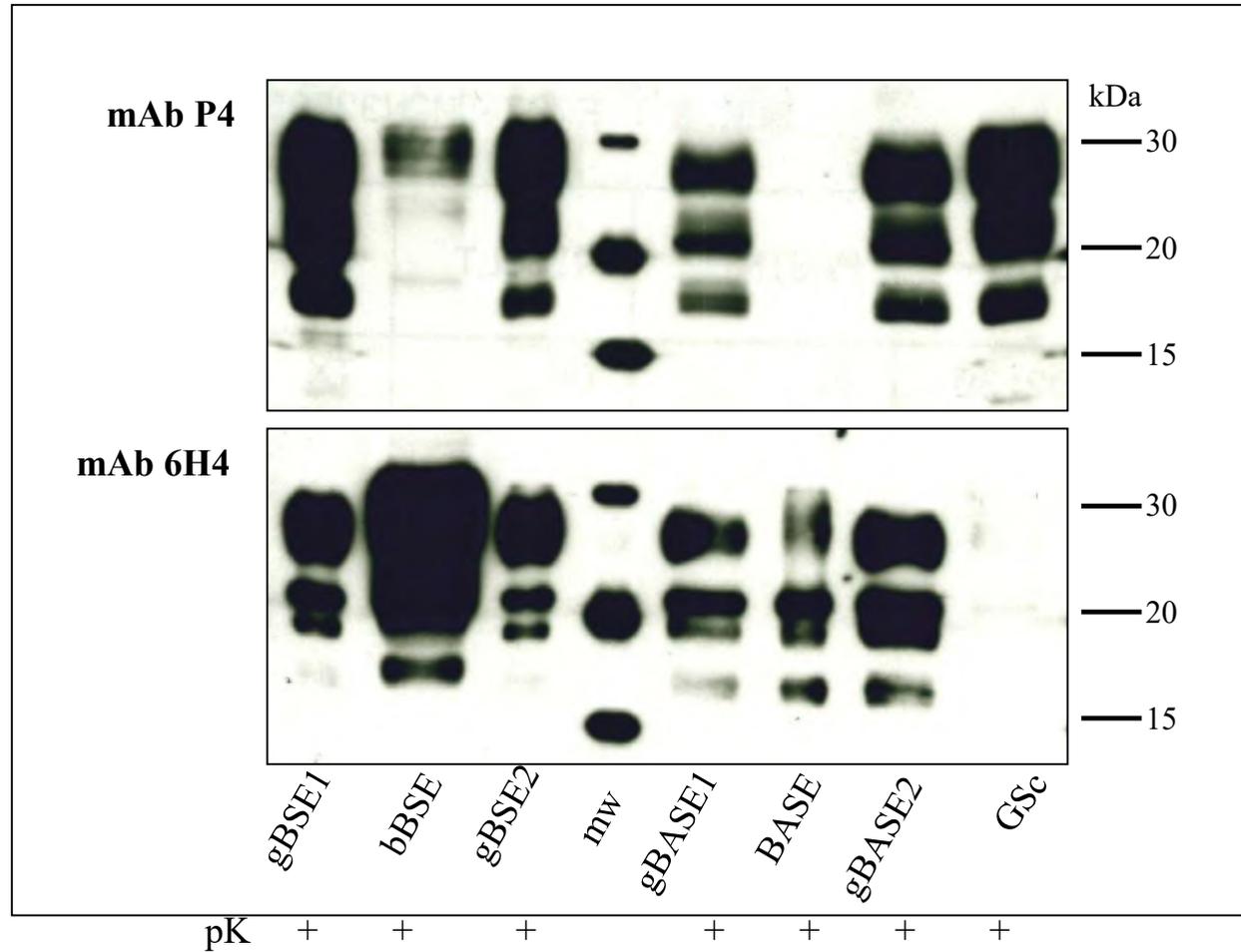
CAPRE BSE i.c.



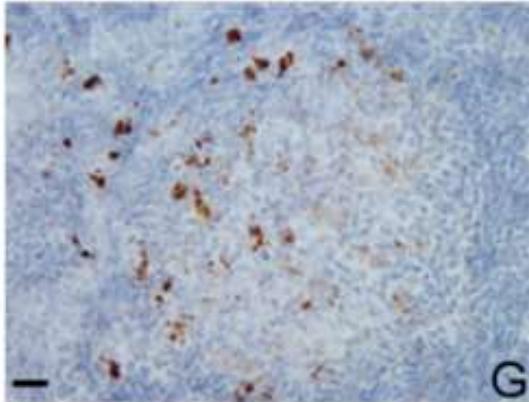
CAPRE BASE i.c.



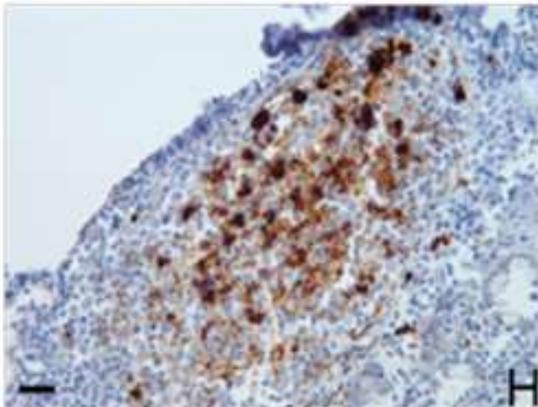
Analisi immunobiochimica:



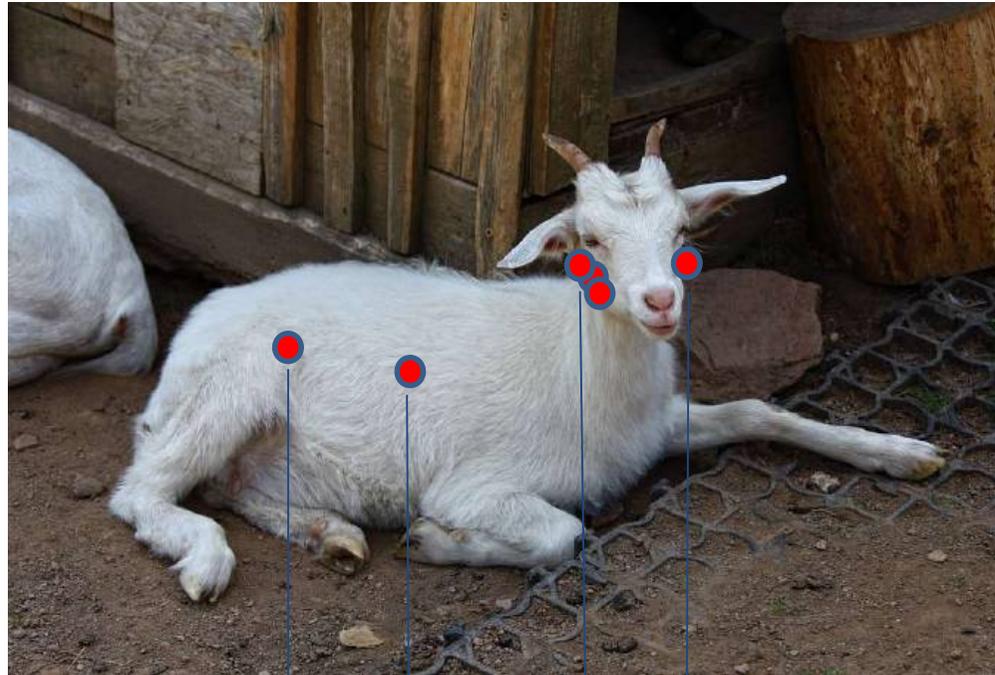
Positività periferica – BSE i.c.



Linfonodo SM



VIC (GALT)



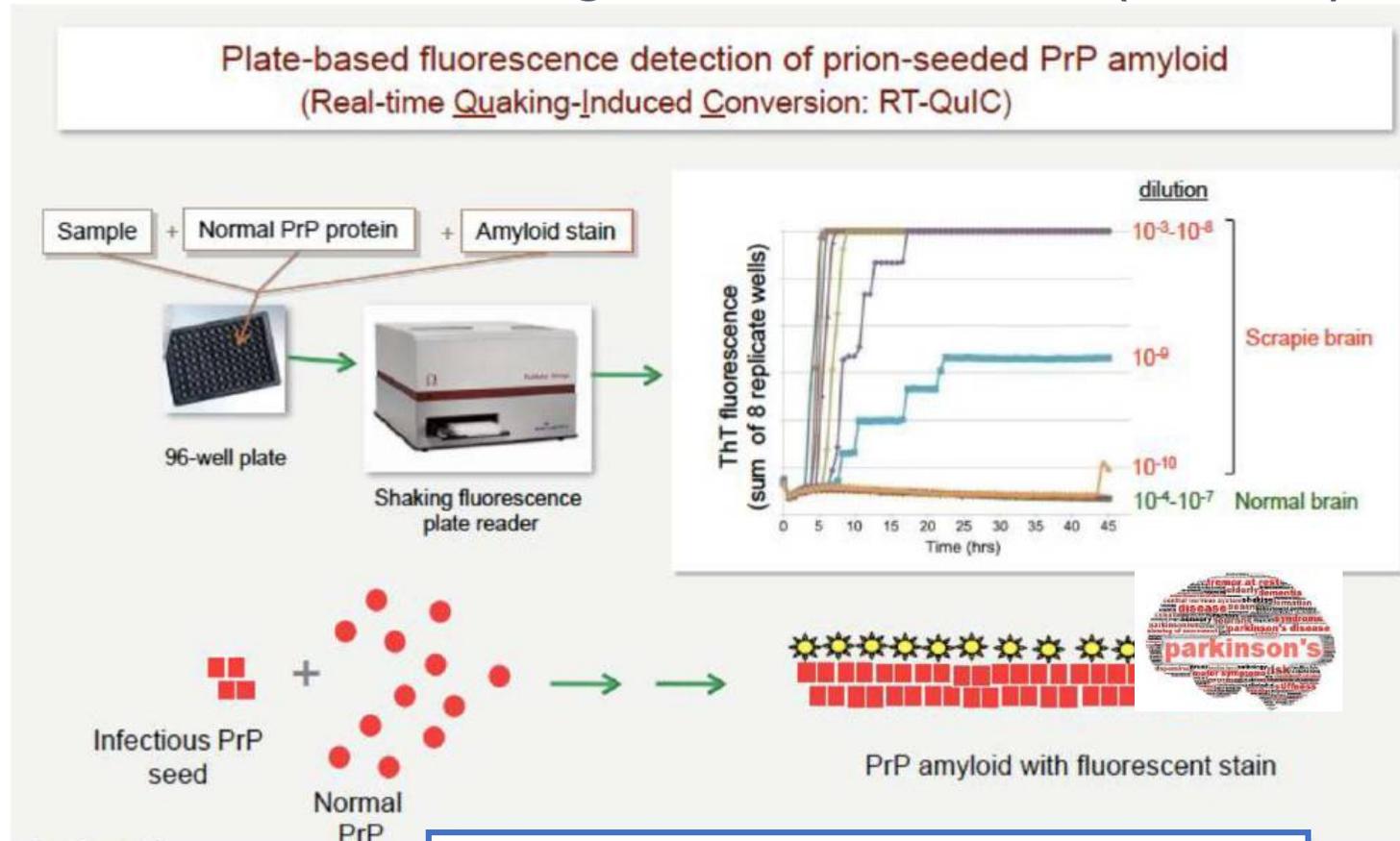
VIC
(IHC+)

MILZA
(WB+)

L.SOTTOMANDIBOLARE
L.RETROFARINGEO
L. PAROTIDEO
TONSILLE
(IHC+)

Nelle capre BASE i.c. non è stata rilevata alcuna positività periferica.

Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QulC)



<https://youtu.be/0FGsb9ZRCYw?t=675>

- Extremely sensitive (≈ 1 fg)
- Up to 1 billion-fold amplification!
- Quantitative
- Disease specific (including some prion-like diseases)
- Much faster and cheaper than similarly sensitive tests

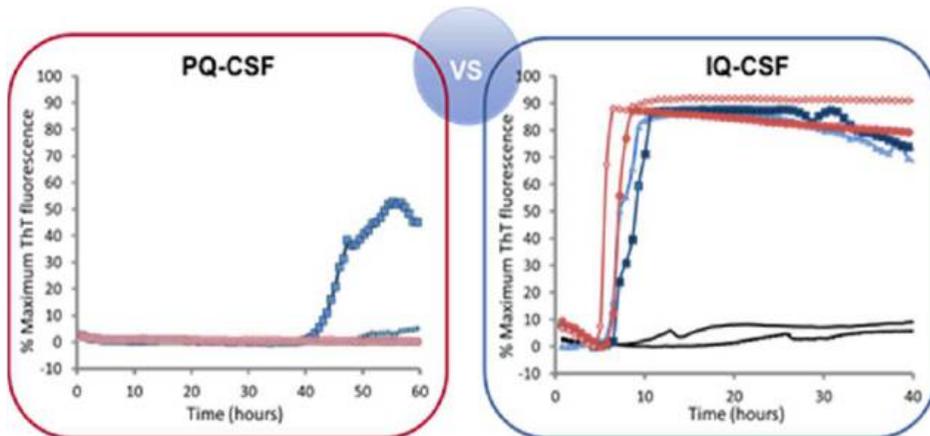
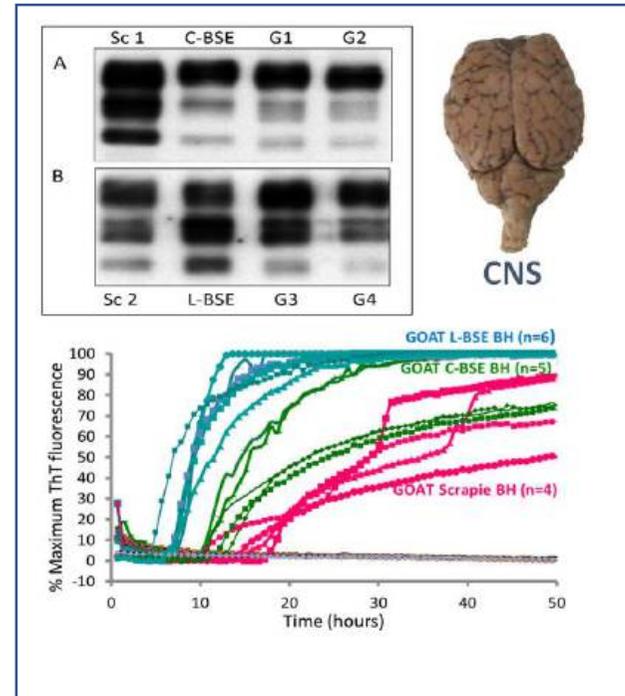
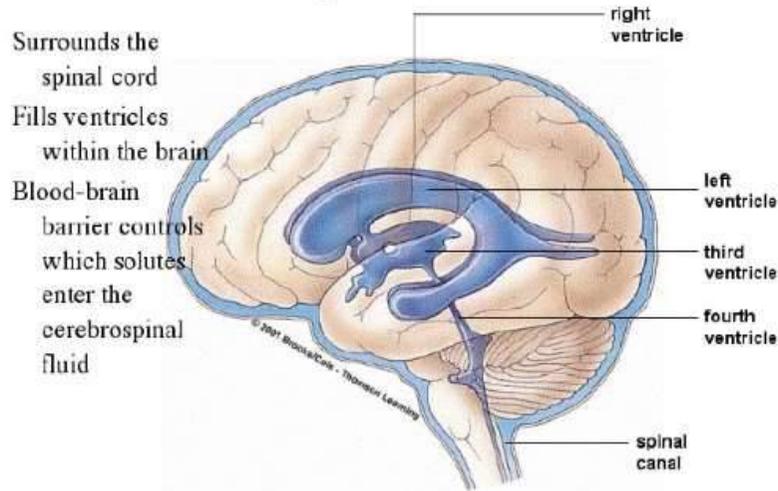
Materiali e metodi: animali campionati

ID	Goat PrP	Breed	Age (years)	Route of infection	Genotype	CNS PrP ^{Sc}	PrP ^{Sc} peripheral distribution
G1	C-BSE	Saanen	2	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	subm.ln, retroph.ln, spleen
G2	C-BSE	Saanen	2	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	subm.ln, retroph.ln, par. ln, icv, spleen
G3	L-BSE	Saanen	3	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	–
G4	L-BSE	Saanen	3	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	–
G5	L-BSE	Saanen	3	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	–
G6	L-BSE	Saanen	3	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	–
G7	L-BSE	Saanen	3	IC	ARQ/ARQ; 240 S/P	+	–
G8	L-BSE	Saanen	3	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	–
G9	C-BSE	Saanen	2	IC	ARQ/ARQ; 240 S/P	+	subm.ln, retroph.ln, par. ln, icv, spleen
G10	C-BSE	Saanen	2	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	subm.ln, retroph.ln, tonsils
G11	C-BSE	Saanen	2	IC	ARQ/ARQ; 240 P/P	+	n. a.
Sc 1	scrapie	Mixed Breed	5	Natural	222 Q/Q	+	n. a.
Sc 2	scrapie	Mixed Breed	2	Natural	222 Q/Q	+	n. a.
CTR 1	None	Mixed Breed	5	–	ARQ/ARQ; 240 P/P	–	–
CTR 2	None	Saanen	2	–	ARQ/ARQ; 240 P/P	–	–



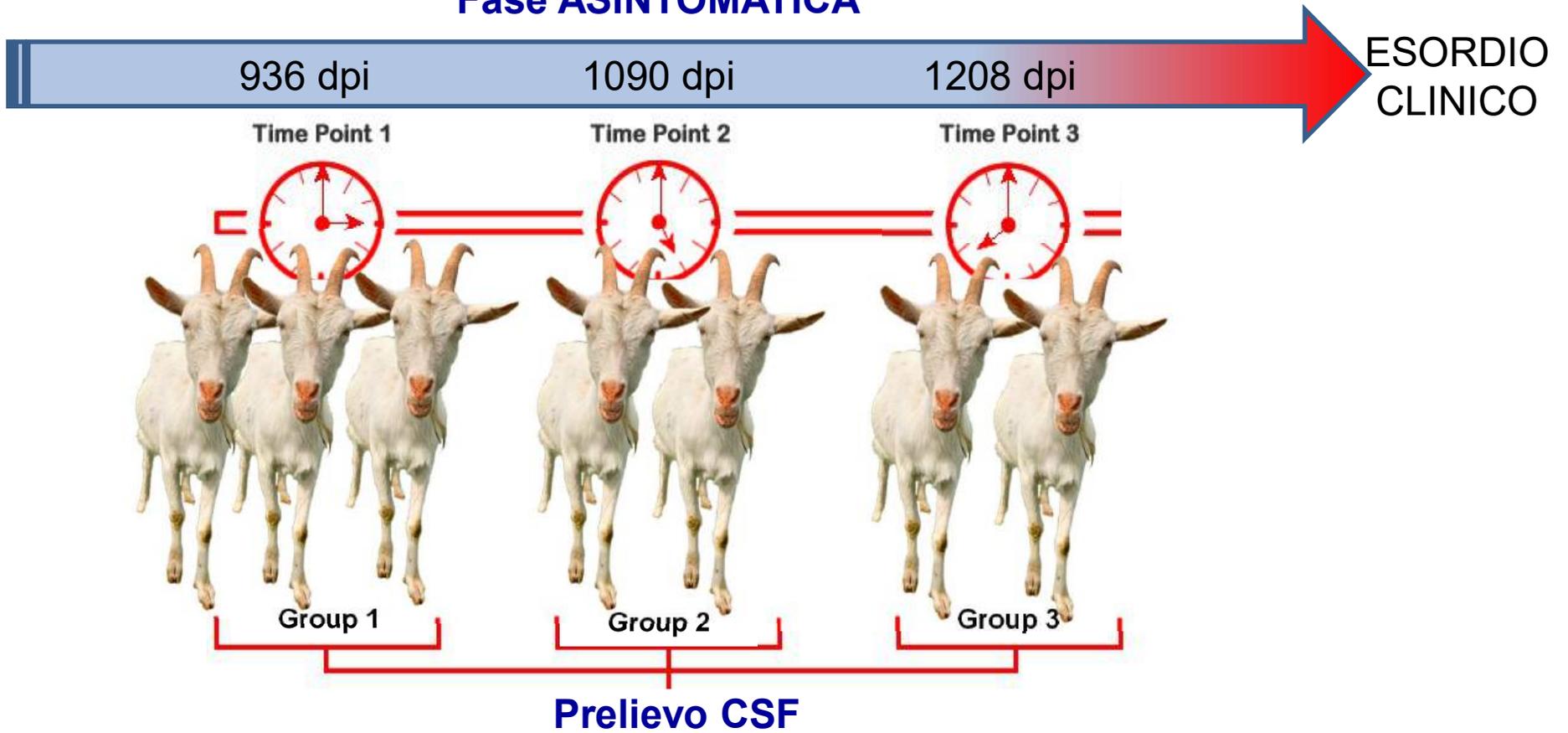
RICERCA DELLA PrP^{Sc} NEL LIQUOR

Cerebrospinal Fluid

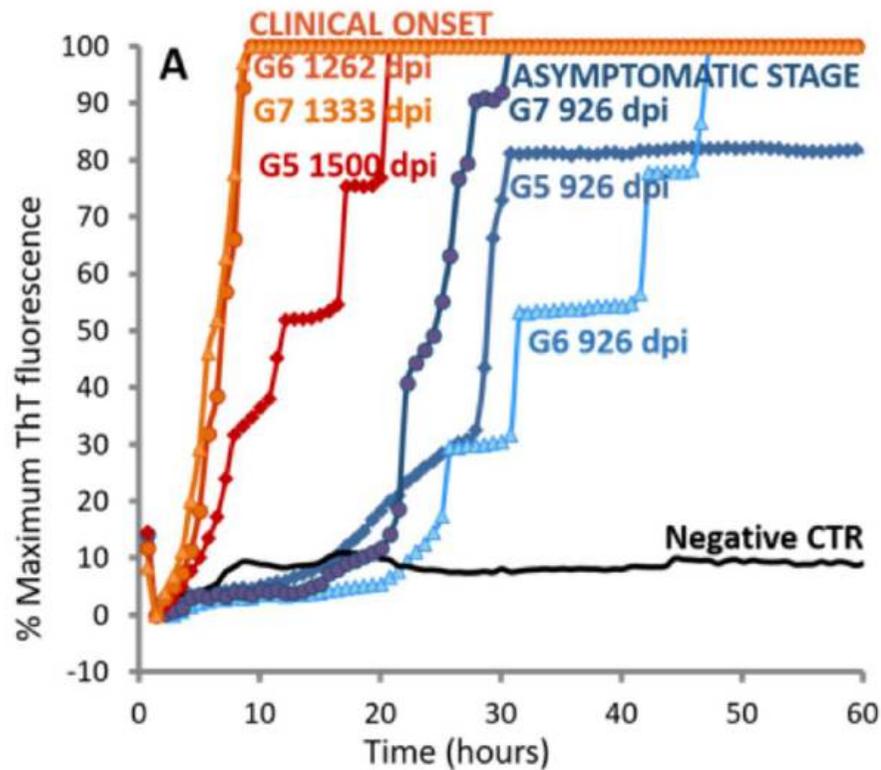


I nostri risultati indicano che siamo in grado di rilevare sensibilmente in meno di 24 ore l'attività di *seeding* associata alla presenza della PrP^{Sc} nel CSF di capre sperimentalmente infette con BASE usando la seconda generazione (IQ-CSF) dei test RT-QuIC

Fase ASINTOMATICA



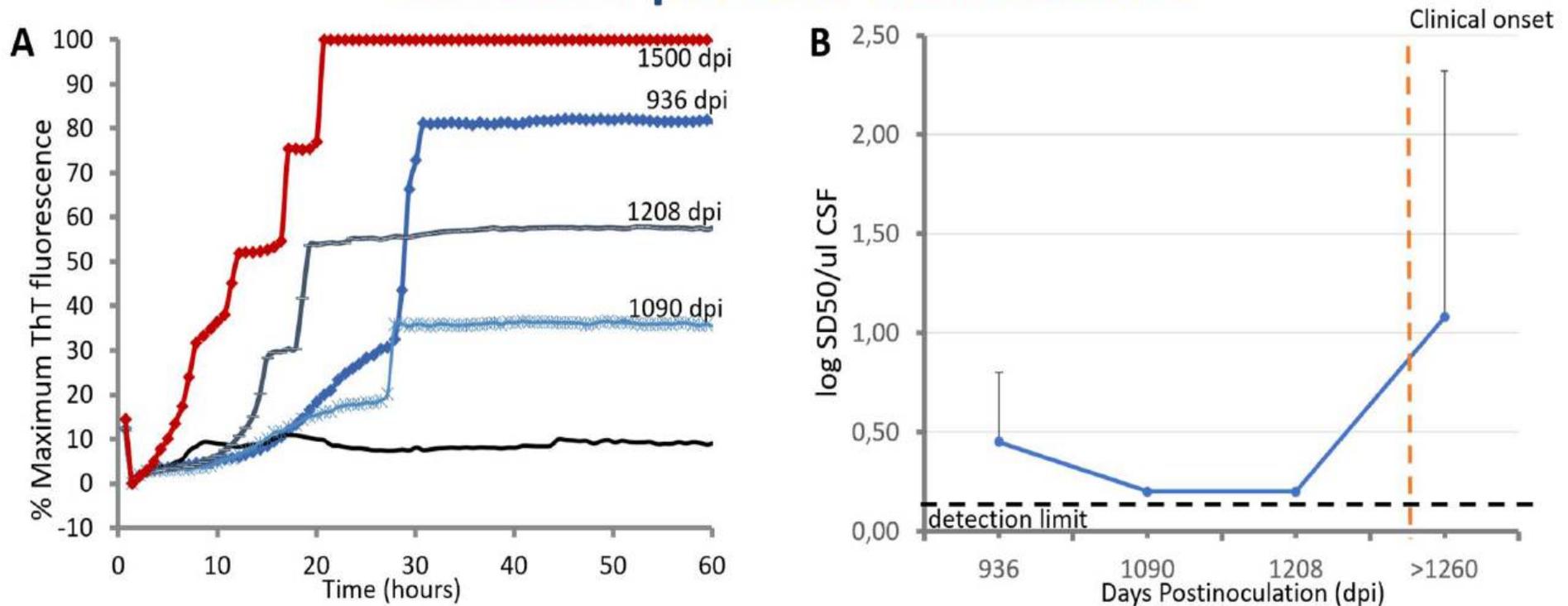
Rilevazione precoce e preclinica della PrPSc nel CSF caprino



ID	Preclinical timepoints at which CSF samples were collected (dpi)	SV (dpi)	IP (dpi)	Pre-clinical PrP detection by IQ-CSF (dbo) ^{Sc}
G5	926, 1080, 1200	1595	1498	574
G6	926, 1080	1352	1260	336
G7	926, 1200	1088	959	407
CTR2	926, 1080, 1200	-	-	-

L'attività di *seeding* associata alla PrPSc è stata rilevata con un tempo medio di **439 giorni** prima della comparsa dei sintomi clinici

Time course dell'attività di *seeding* associata alla PrPSc durante il periodo asintomatico



Utilizzando l'analisi Spearman-Kärber dei dati abbiamo stimato la dose di semina al 50% [SD50] in condizioni IQ-CSF

CAPRE - Risultati:

	BSE i.c.	BASE i.c.	BASE os
IP ± SD (dpi)	568,25 (± 30,72)	1081,33 (± 321,57)	2370 (79 mesi circa)
AR ± SD	4/4	6/6	0/6
SV ± SD (dpi)	624,5 (± 28,36)	1239 (± 283,93)	-
Sintomi principali	Stato mentale alterato Lesioni cutanee Nervi cranici e reazioni posturali alterate Nibble positivo	Stato mentale alterato Lesioni cutanee Lievi deficit dei nervi cranici Tremori Nibble positivo	-

Vallino Costassa E., Plos One 2018
Favole A., BMC Research Notes 2021

Test rapido IDEXX HerdChek Antigen kit

BSE i.c.

ID	DO
69556:	3.999
69557:	3.999
81553:	3.999
81556:	3.999
81559:	3.999
69538:	0.033C-

BASE i.c.

ID	DO
69548:	3.999
81554:	3.999
81557:	3.999
81560:	3.294
69540:	3.999
81563:	0.040C-

BASE os

ID	DO
69536:	0.040
69561:	0.028
69558:	0.035
68175:	0.040
69559:	0.033
69560:	0.040C-

Trasmissione per via orale: test di conferma



Esame istologico



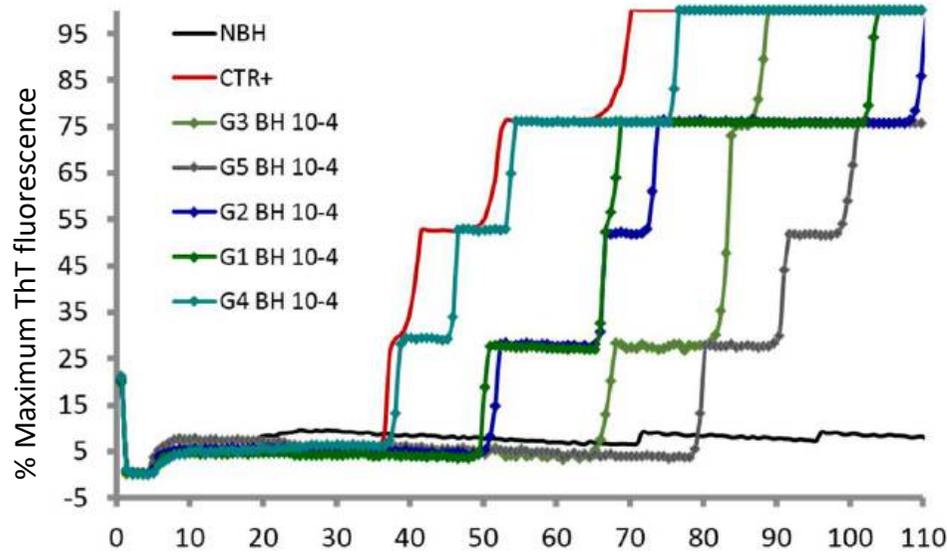
Esame immunoistochimico



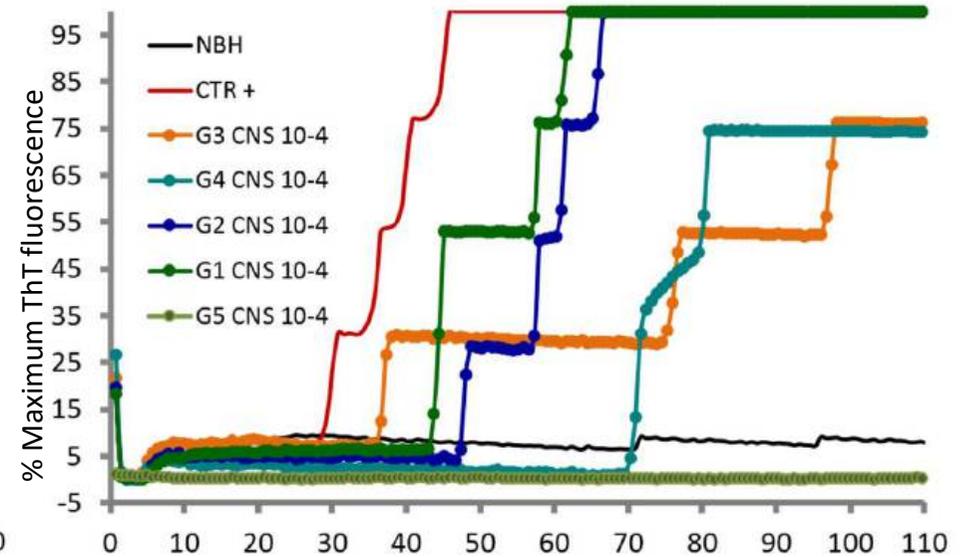
Western blot



Trasmissione per via orale: rilevazione della PrPSc nel SNC

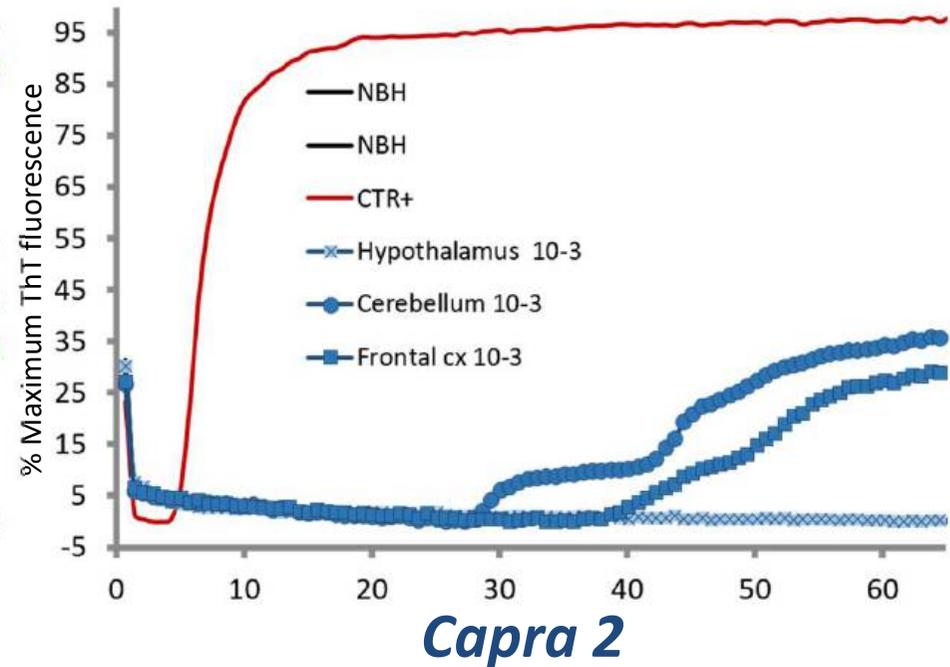
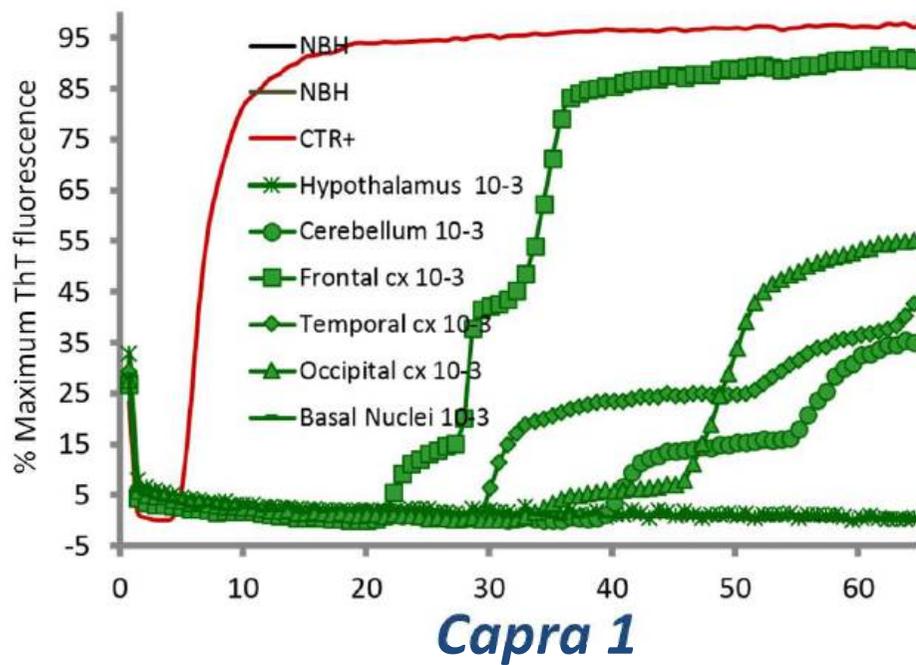


Tronco encefalico 5/5

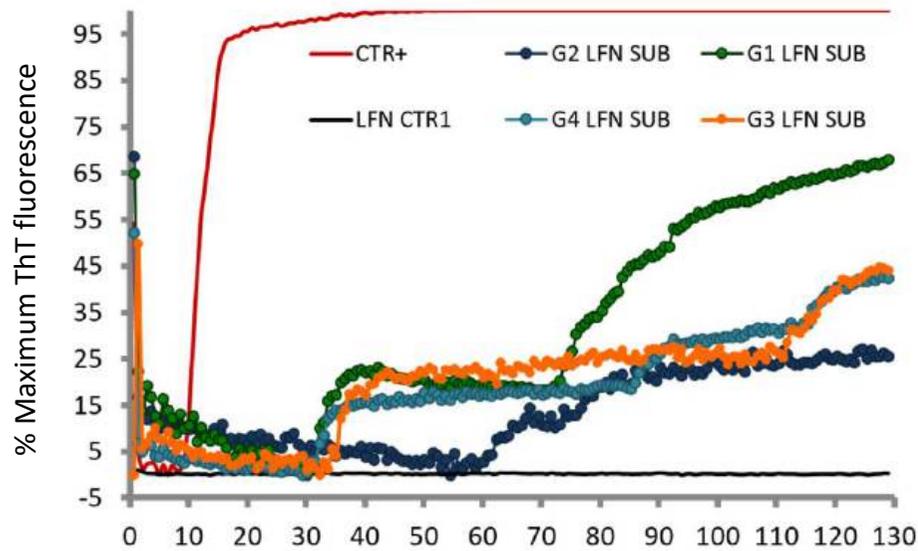


Encefalo - Pool (4/5)

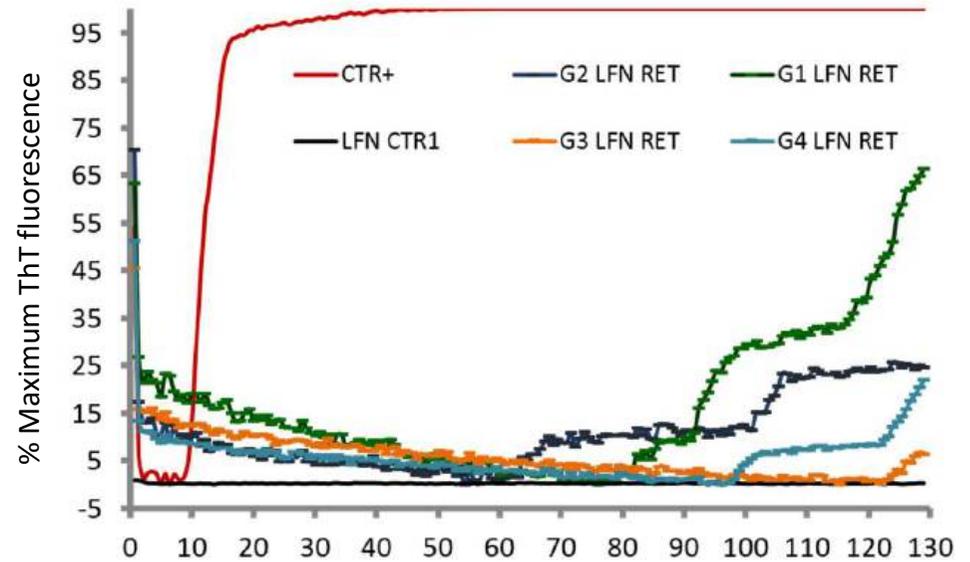
Trasmissione per via orale: aree di deposizione della PrPSc nel SNC



Trasmissione per via orale: deposizione della PrPSc nel SLR

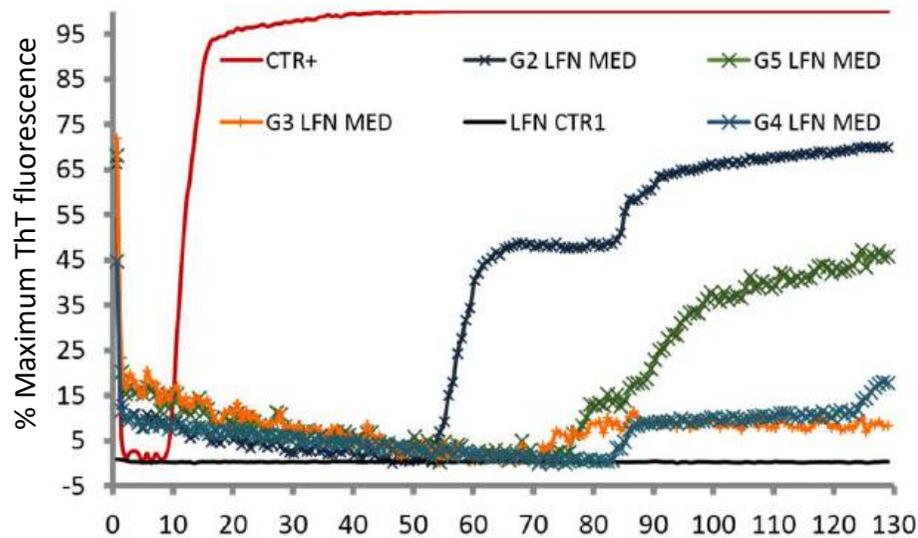


Lnf. Sottomandibolare 4/4

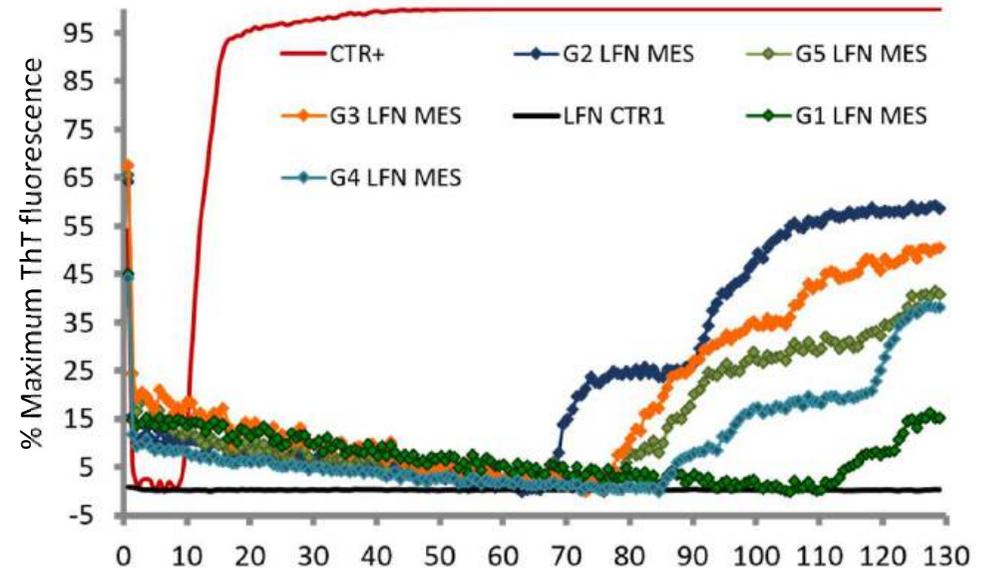


Lnf. Retrofaringeo 3/4

Trasmissione per via orale: deposizione della PrPSc nel SLR

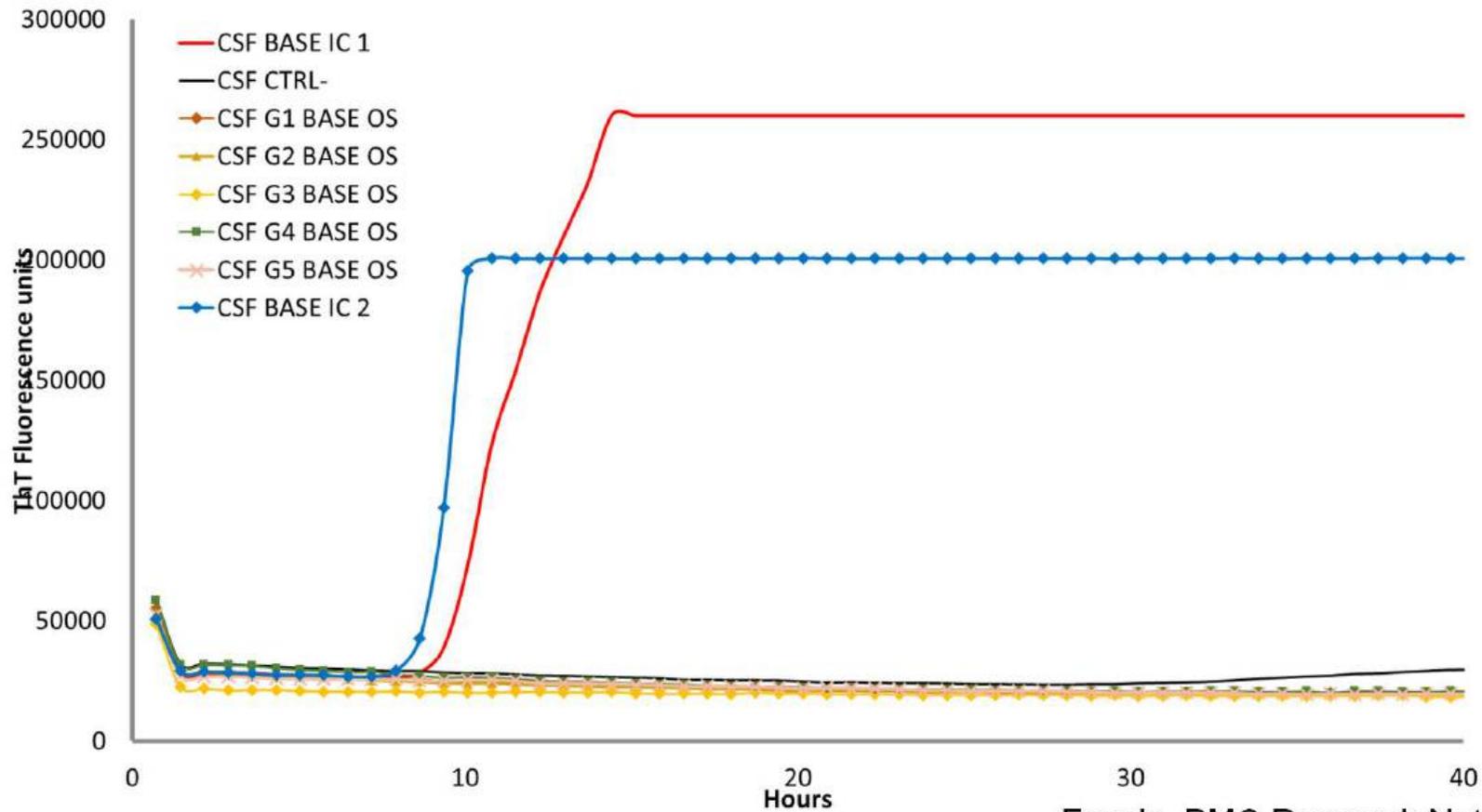


Lnf. Mediastinici 3/4



Lnf. Meseraici 5/5

Trasmissione per via orale: ricerca della PrPSc nel liquor



Favole, BMC Research Notes 2021



Conclusioni :

- BSE e BASE sono trasmissibili come ceppi distinti nella specie caprina tuttavia tale specie sembra essere maggiormente suscettibile alla cBSE rispetto alla L-BSE
- Sperimentalmente cBSE e L-BSE nella capra presentano quadri clinici sovrapponibili e simili a quelli riportati nella stessa specie da altri autori in corso di BSE sperimentale e scrapie naturale (*Konold et al. 2010*). Non si può escludere che la L-BSE possa decorrere in forma asintomatica.
- L'attuale Sistema di sorveglianza (test rapidi, test di conferma) è in grado di individuare e caratterizzare forme conclamate di malattia indotte dalla L-BSE ma potrebbe fallire nel caso di forme pauci o asintomatiche.



Conclusioni :

- La ridotta quantità di PrPSc associata all'infezione per via orale nella capra è stata rilevata esclusivamente mediante RT-QuIC che si conferma quale tecnica estremamente sensibile. Pertanto un ampliamento degli attuali criteri diagnostici andrebbe considerato.
- Sebbene la sola presenza di PrPSc non sia indicativa di infettività del tessuto, la presenza di positività identificata a livello di Sistema linforeticolare deve allertare circa il possibile coinvolgimento di tessuti periferici che potrebbero rappresentare un possibile rischio per l'uomo.
- Applicabilità dell'IQ-CSF quale potenziale test intra vitam per la diagnosi di TSE



Ringraziamenti



Alessandra Favole
Elena Vallino Costassa
Maria Caramelli
Cristina Casalone
Elena Berrone
Marina Gallo
Claudia Palmitessa
Monica LoFaro
Jeanne Lai
Saverio Bessone
Barbara Iulini
Maria Mazza
Daniela Meloni
Simone Peletto
Valerio Benedetti
Camilla Testori



Antonio D'Angelo
Giulia Cagnotti



Guerino Lombardi
Nicola Martinelli
Giacomo Savoldi



Ministero della Salute

IZSPLV 04/2008RC
RF-2009-1474758

Grazie per l'attenzione





istituto zooprofilattico sperimentale

del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta



del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta

J. Altara

Via Bologna, 148 - 10154 Torino - IT - Tel. +39 01126861

Pec: izsto@legalmail.it - web: www.izsplv.it