



**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

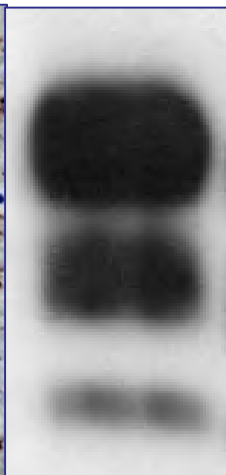
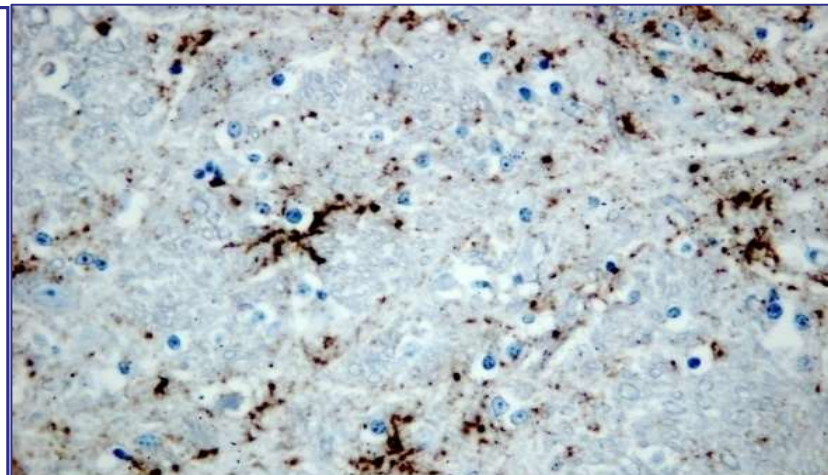
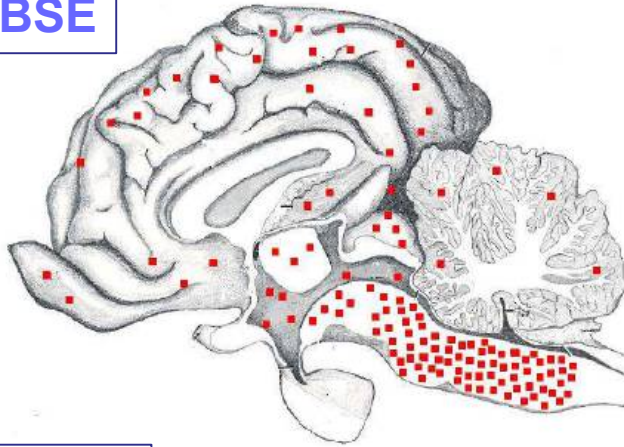
**Torino 27 Gennaio 2022**

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

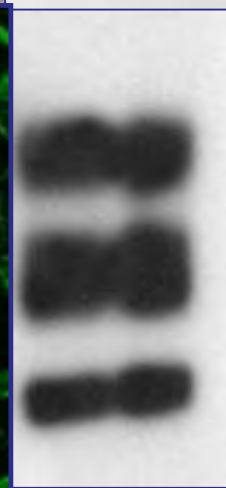
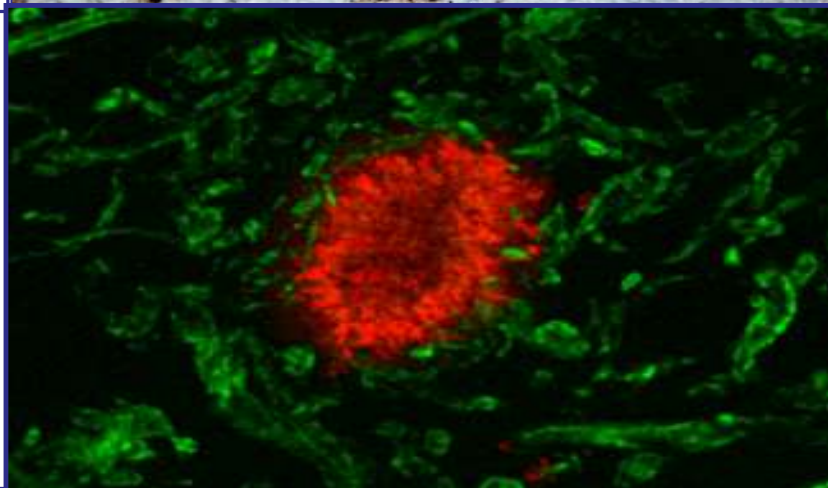
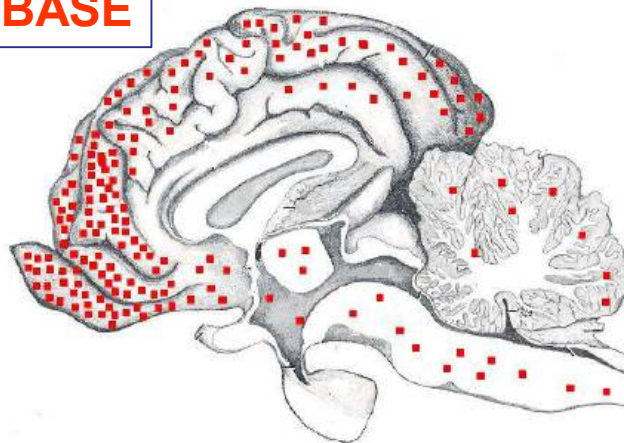
PNAS

Cristina Casalone<sup>\*†</sup>, Gianluigi Zanusso<sup>†‡</sup>, Pierluigi Acutis<sup>\*</sup>, Sergio Ferrari<sup>‡</sup>, Lorenzo Capucci<sup>§</sup>, Fabrizio Tagliavini<sup>¶</sup>, Salvatore Monaco<sup>¶</sup>, and Maria Caramelli<sup>\*</sup>

BSE



BASE



# Caratterizzazione del ceppo



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



TgBov	L-type
TgOv	L-type/ <b>C-BSE</b>
TgHu.	L-type/ n.t.
Tga20	n.t.
C57BL/6	L-type
SJL	L-type
VM	L-type
RIII	<b>C-BSE</b>
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

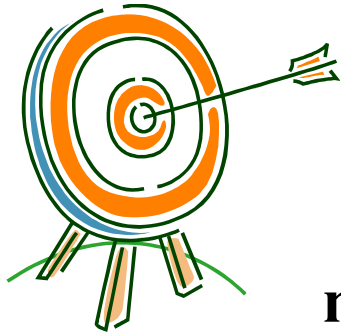
**Marc Eloït, Karim Adjou, Muriel Culpier, Jean Jacques Fontaine, Rodolphe Hamel, Thomas Lilin, Sébastien Messiaen, UMR 1161 INRA/AFSSA/ENVA, 7 avenue de Général de Gaulle, 94704 Maisons Alfort, France**

## 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:

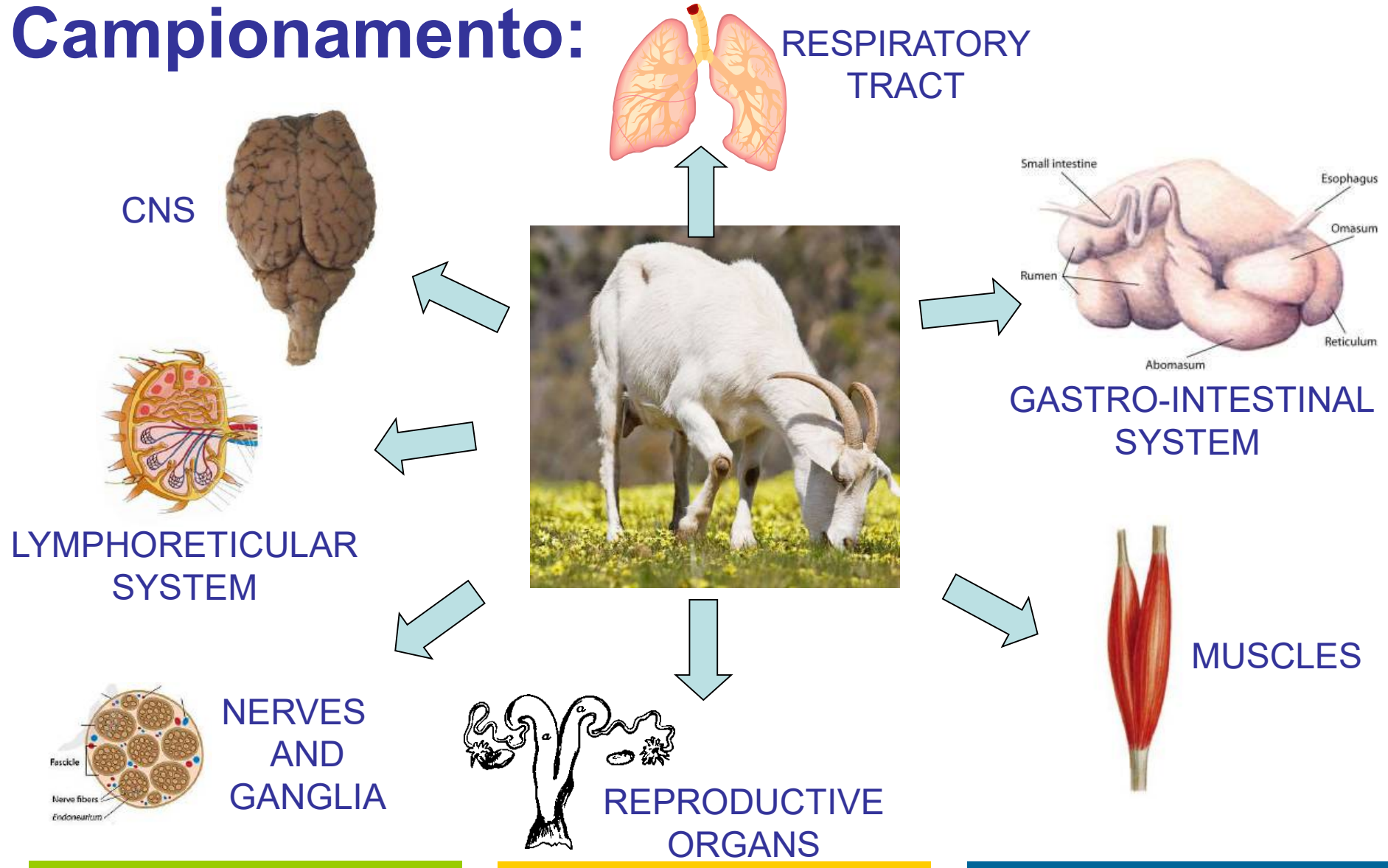
	<b>BSE i.c.</b>	<b>BASE i.c.</b>	<b>BASE os</b>
<b>N. Capre</b>	5 + 1 ctrl	6 + 2 ctrl	5 + 1 ctrl
<b>Data di inoculo</b>	Settembre 2011	Settembre 2011	Settembre 2011
<b>Inoculo</b>	0,5 ml 10%	0,5 ml 10%	20 ml 30%
<b>Tipo inoculo</b>	IT 89109	IT 141387	IT 141387
<b>Genotipo</b>	Wild type	Wild type	Wild type
<b>Età all'inoculo</b>	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
<b>IP ± SD (dpi)</b>	568,25 (± 30,72)	1081,33 (± 321,57)	2370 (79 mesi circa)
<b>AR ± SD</b>	4/4	6/6	0/6
<b>SV ± SD (dpi)</b>	624,5 (± 28,36)	1239 (± 283,93)	-
<b>Sintomi principali</b>	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

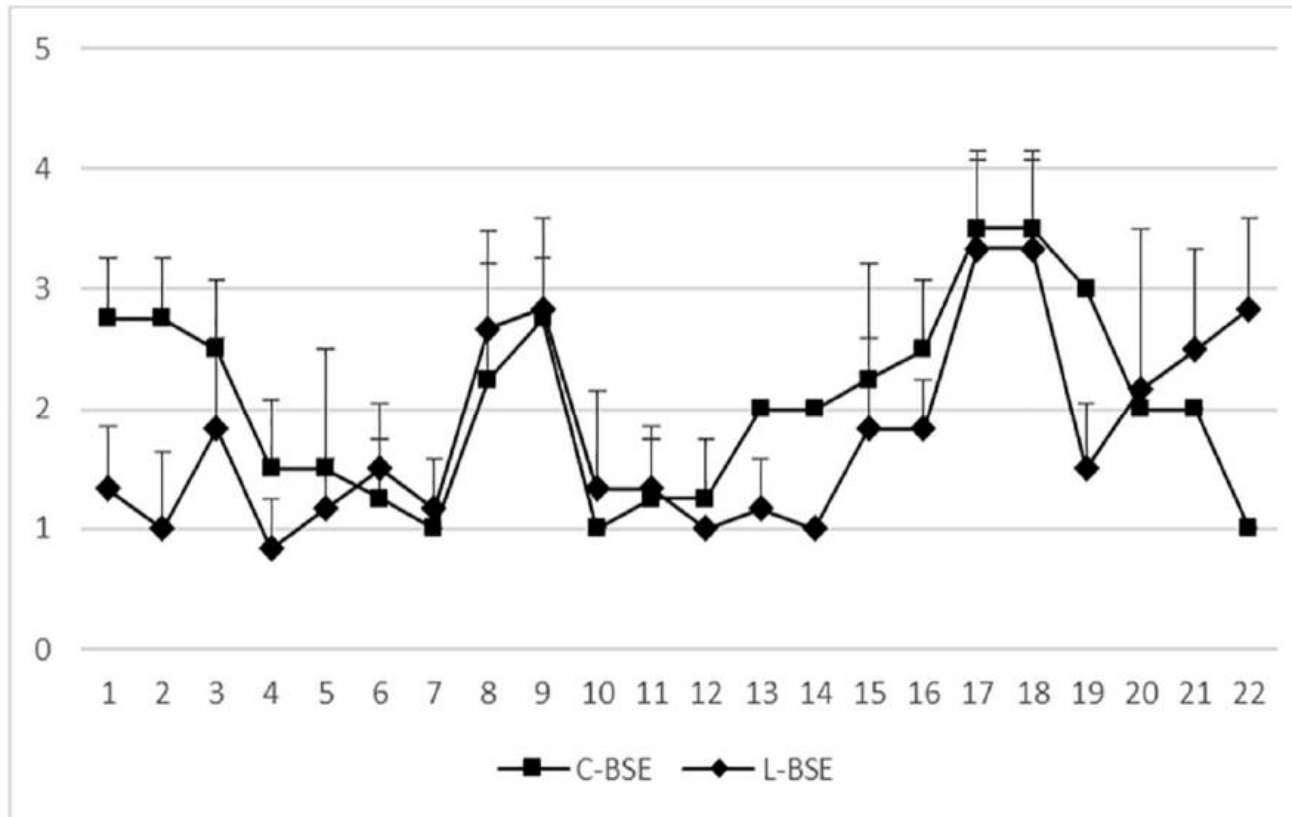
## BSE i.c.

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-

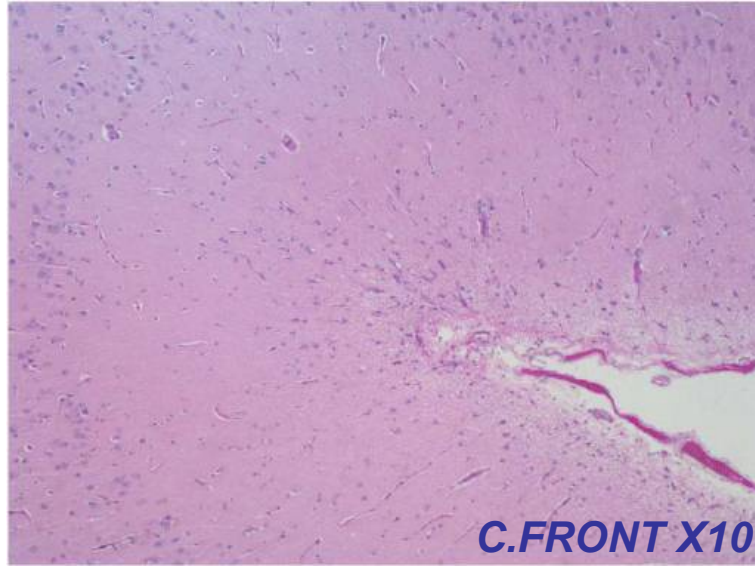
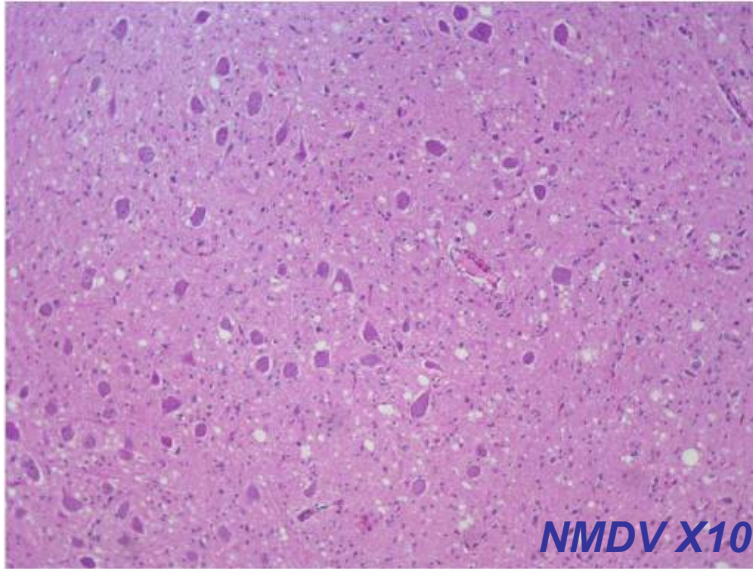
# Lesion profiles:



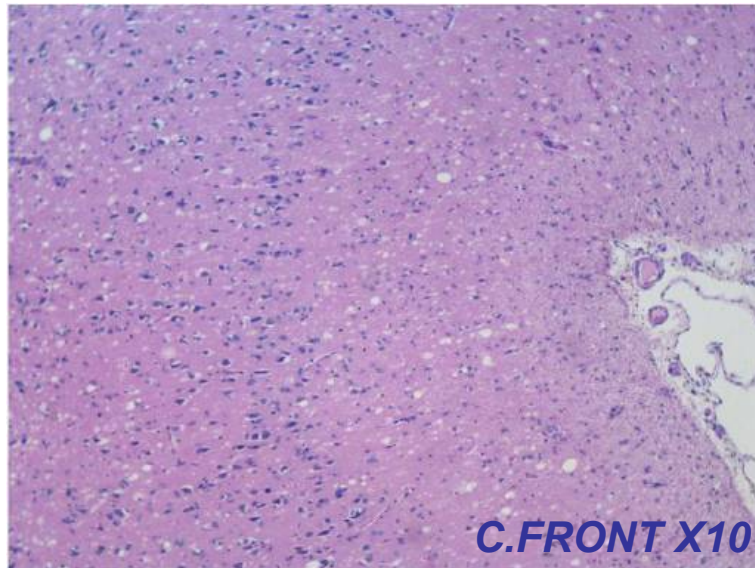
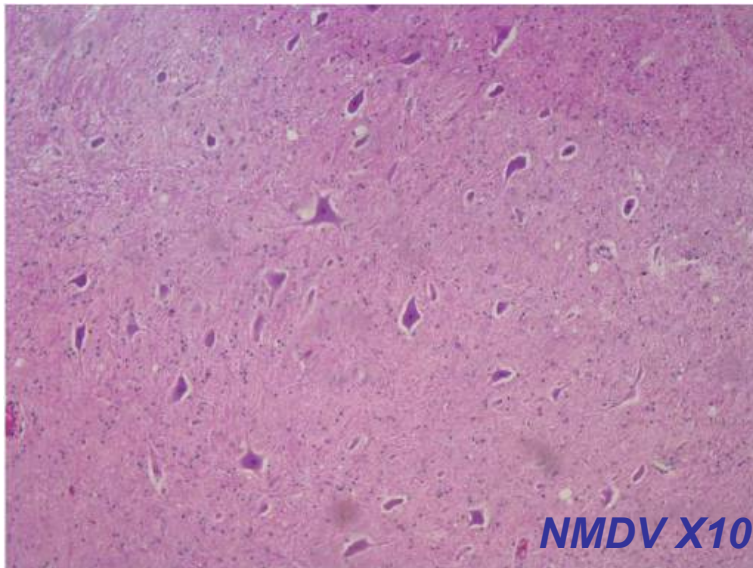
Brainstem - DMV	1
Brainstem - N.of the hypoglossal	2
Brainstem - Olfactory nuclei	3
Brainstem - N. trigeminal nerve	4
Brainstem - Cuneate N.	5
Brainstem - Reticular formation	6
Dorsal Medulla	7
Ventral Medulla	8
Pons - Vestibular nuclear c.	9
Cerebellum - Granular I.	10
Cerebellum - Molecular I.	11
Midbrain - 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



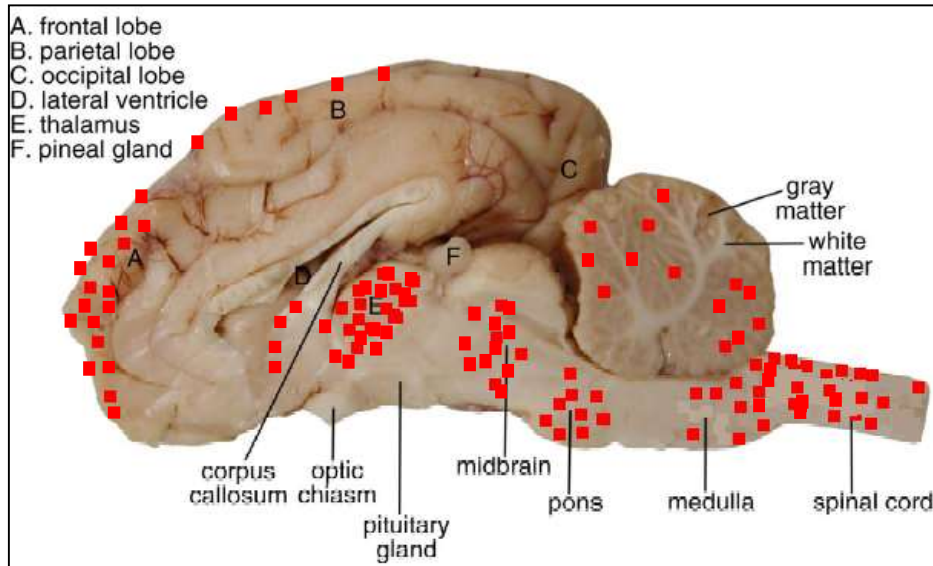
**BSE i.c.**



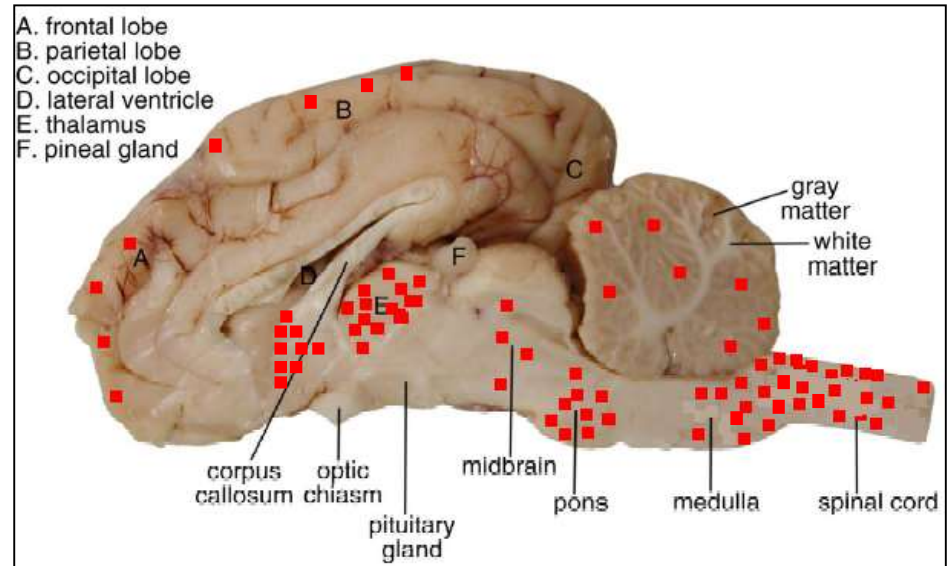
**BASE i.c.**



## Distribuzione della PrPSc:



**BSE i.c.**



**BASE i.c.**

# Patterns di deposizione della PrPSc

*CAPRE BSE i.c.*

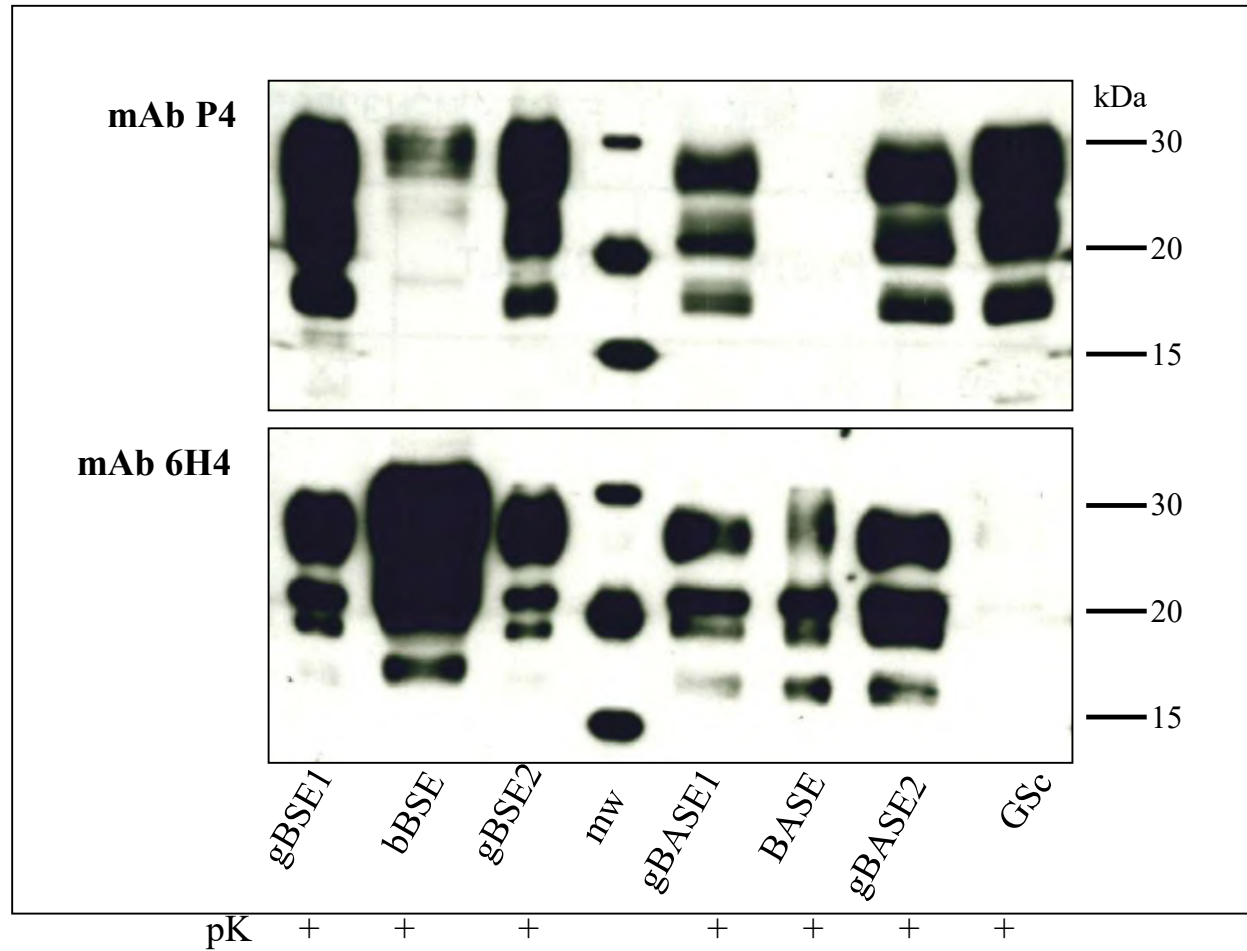


*CAPRE BASE i.c.*

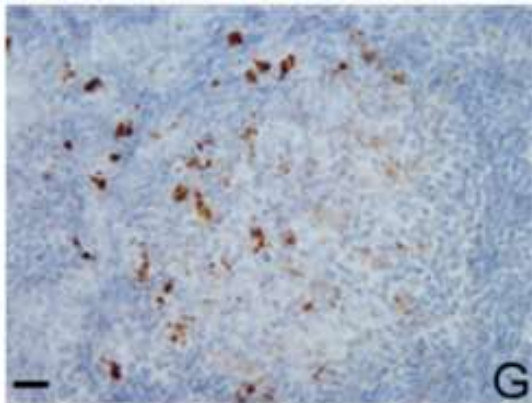




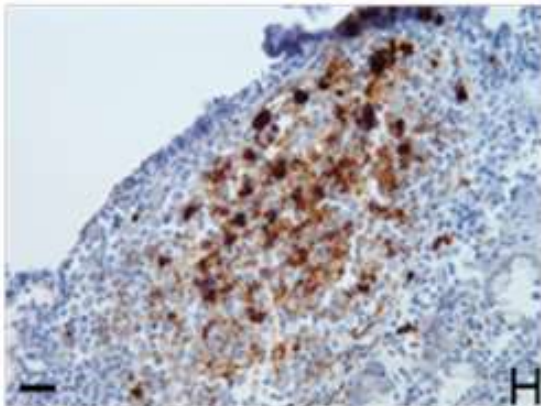
# Analisi immunobiochimica:



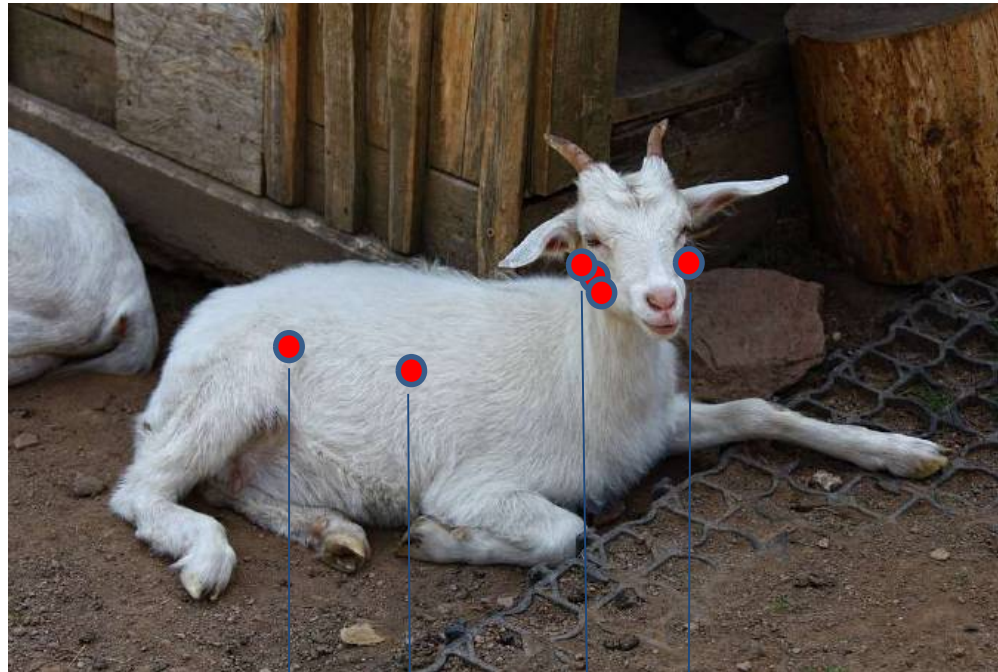
## Positività periferica – BSE i.c.



Linfonodo SM



VIC (GALT)



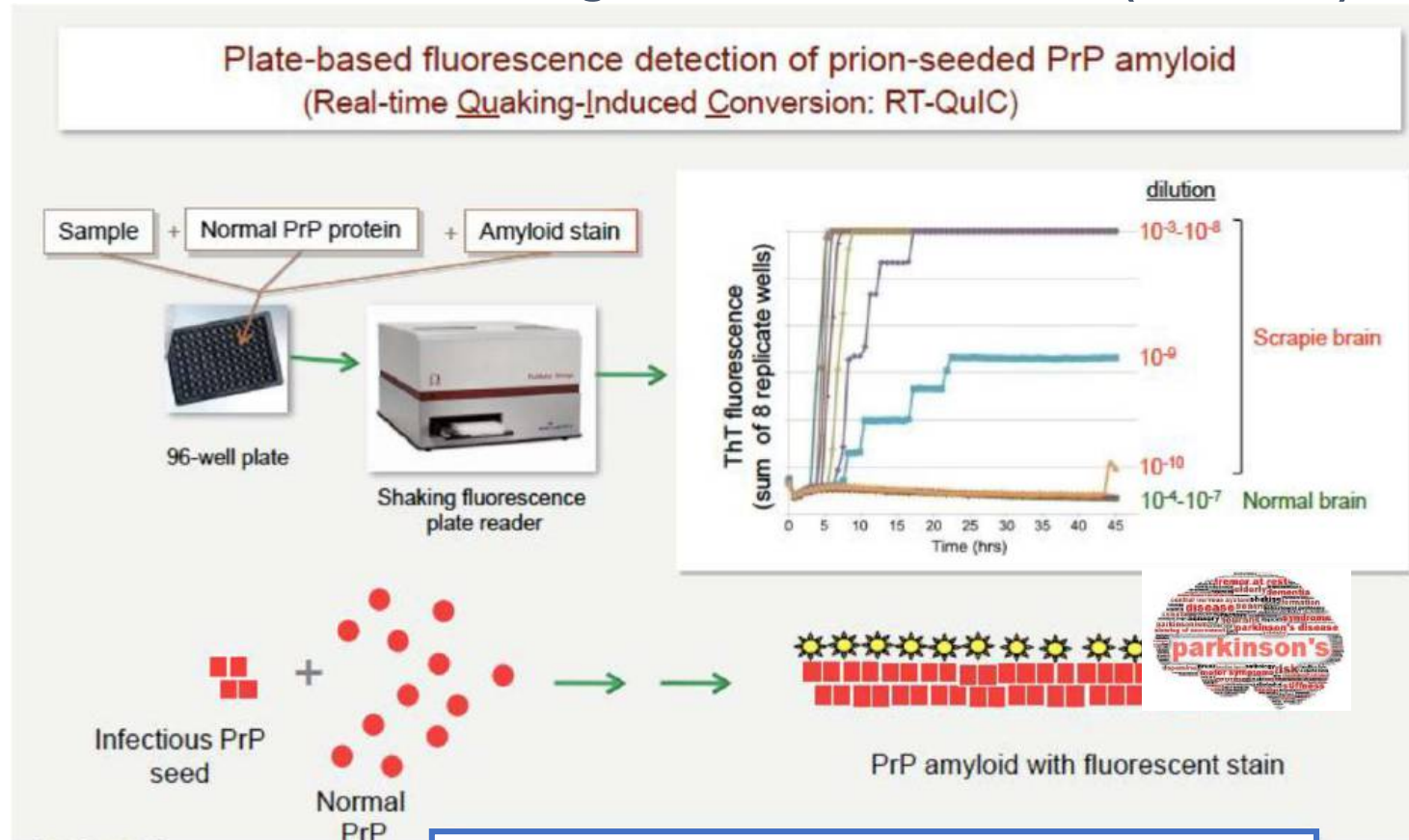
VIC  
(IHC+)

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

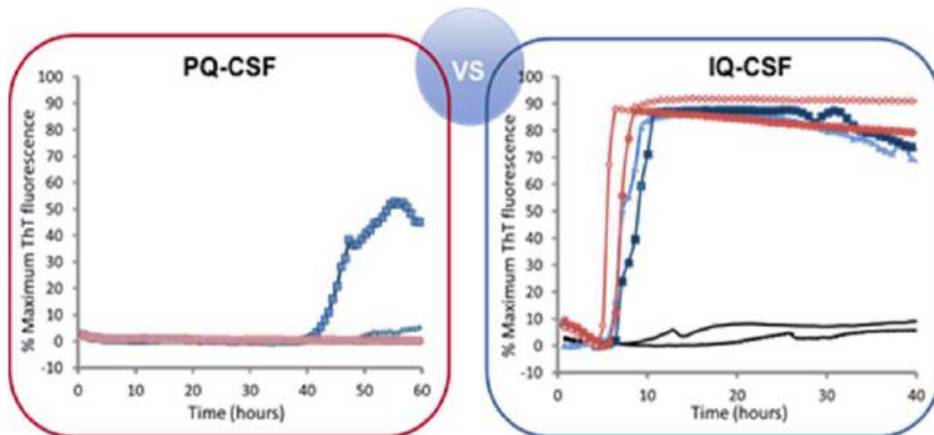
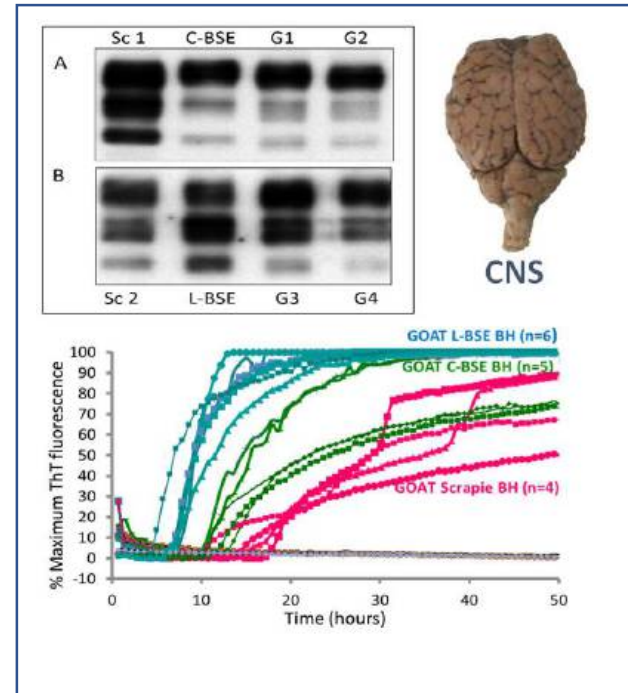
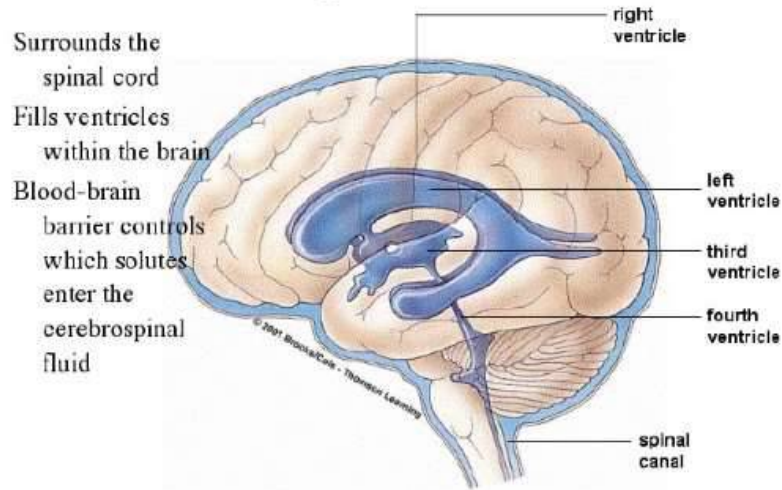
## Materiali e metodi: animali campionati

ID	Goat PrP	Breed	Age (years)	Route of infection	Genotype	CNS PrP <sup>Sc</sup>	PrP <sup>Sc</sup> 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	–	–



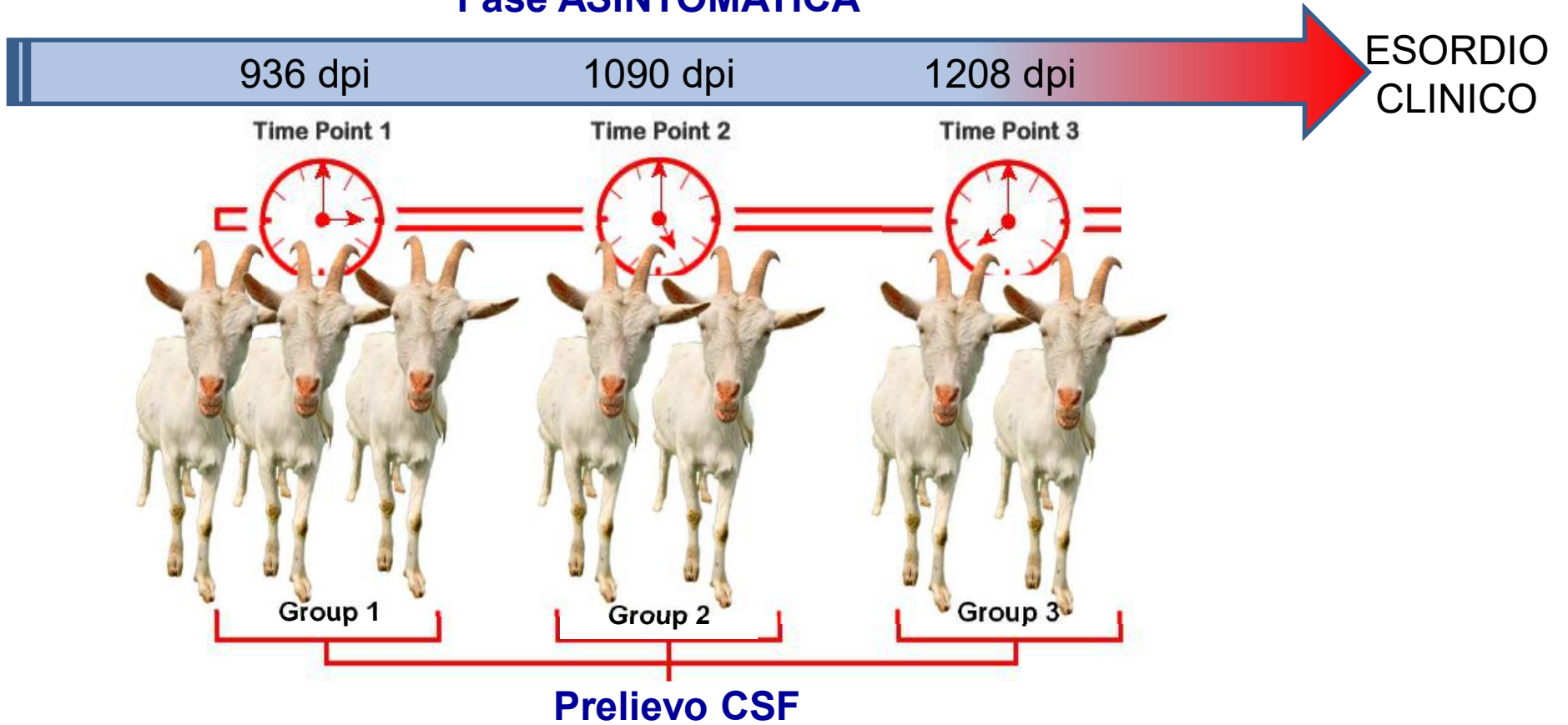
# RICERCA DELLA PrP<sup>Sc</sup> NEL LIQUOR

## Cerebrospinal Fluid

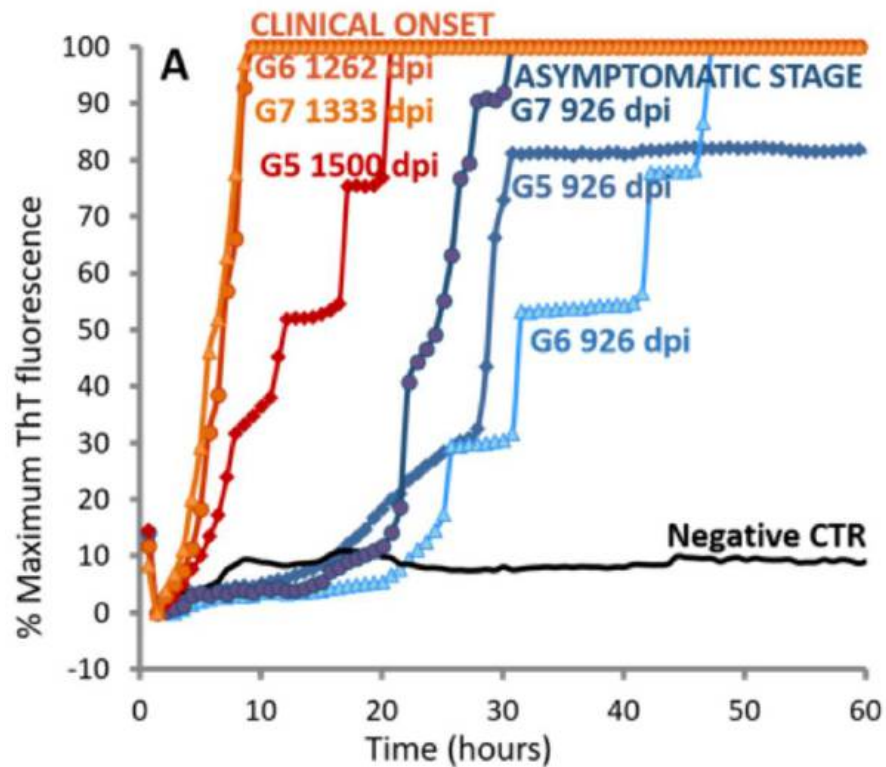


I nostri risultati indicano che siamo in grado di rilevare sensibilmente in meno di 24 ore l'attività di *seeding* associata alla presenza della PrP<sup>Sc</sup> nel CSF di capre sperimentalmente infette con BASE usando la seconda generazione (IQ-CSF) dei test RT-QuIC

## Fase ASINTOMATICA



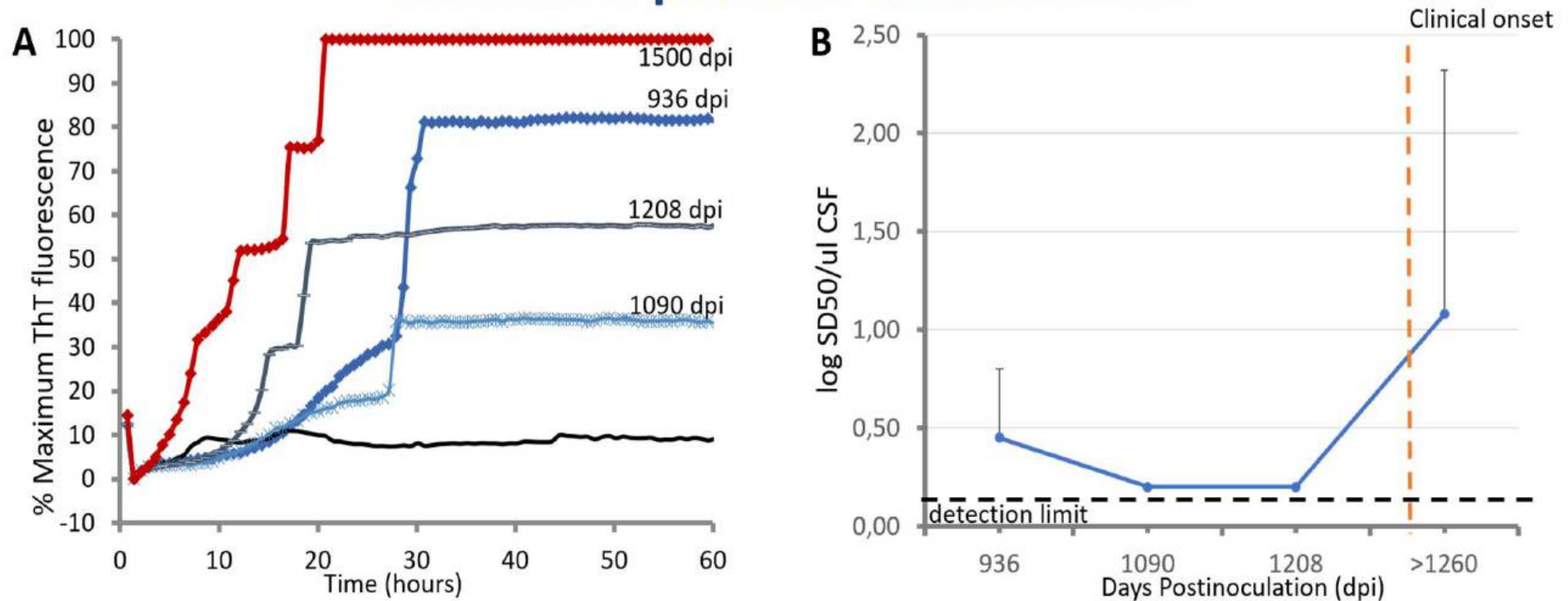
## Rilevazione precoce e preclinica della PrPSc nel CSF caprino



ID	Preclinical timepoints at which CSF samples were collected (dpi)	SV (dpi)	IP (dpi)	Pre-clinical PrP <sup>Sc</sup> detection by IQ-CSF (dbo)
G5	926, 1080, 1200	1595	1498	<b>574</b>
G6	926, 1080	1352	1260	<b>336</b>
G7	926, 1200	1088	959	<b>407</b>
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
<b>IP ± SD (dpi)</b>	568,25 (± 30,72)	1081,33 (± 321,57)	2370 (79 mesi circa)
<b>AR ± SD</b>	4/4	6/6	0/6
<b>SV ± SD (dpi)</b>	624,5 (± 28,36)	1239 (± 283,93)	-
<b>Sintomi principali</b>	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



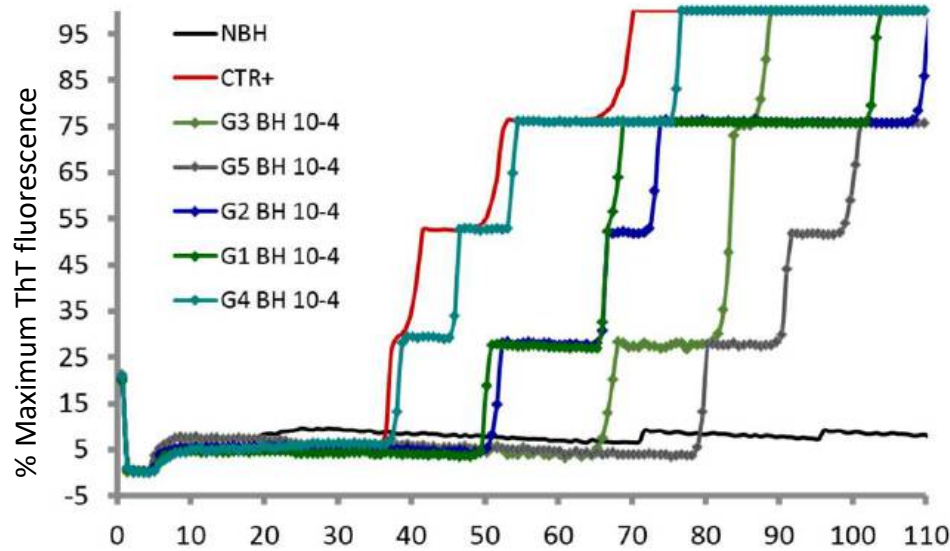
Esame immunoistochimico



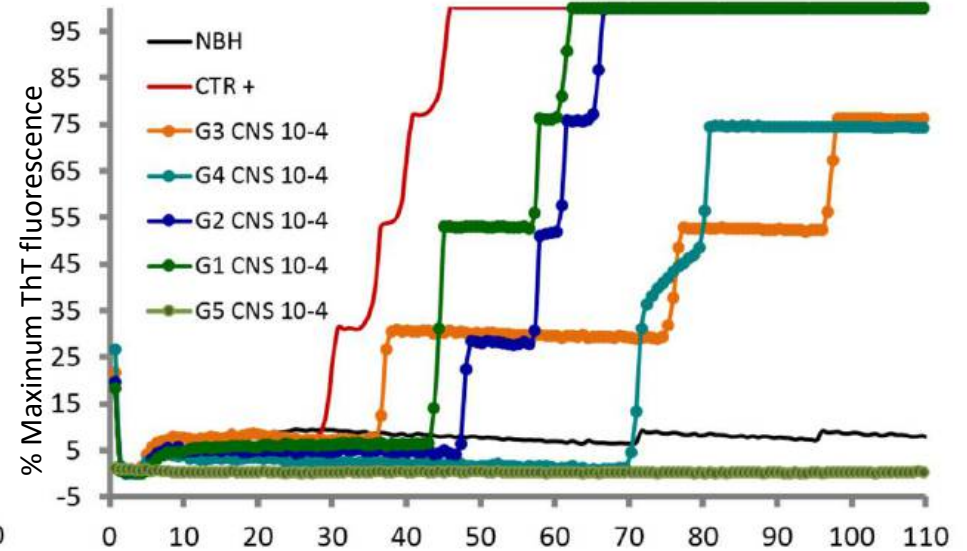
Western blot



## Trasmissione per via orale: rilevazione della PrPSc nel SNC

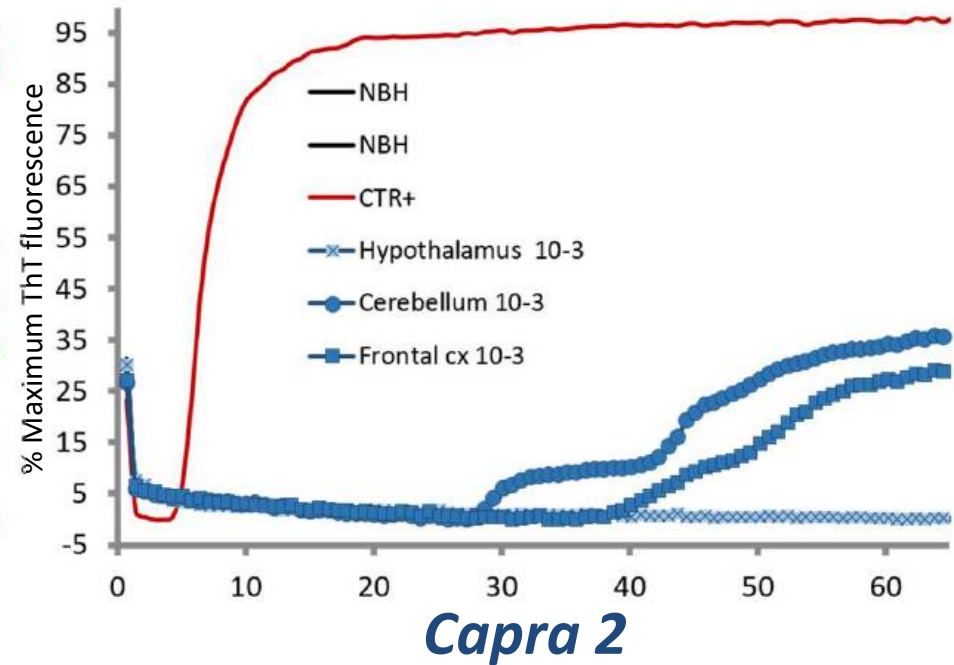
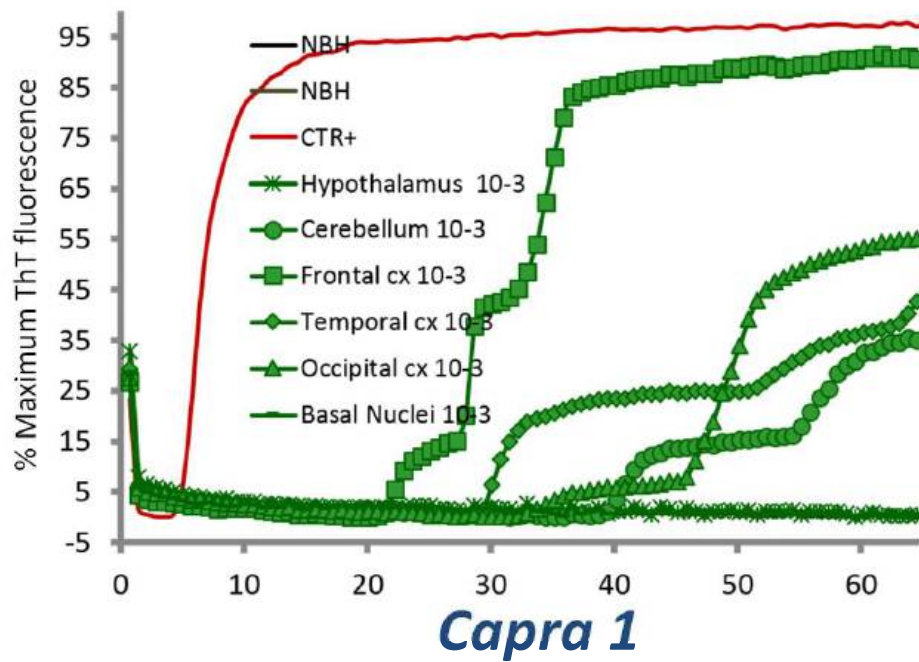


*Tronco encefalico 5/5*

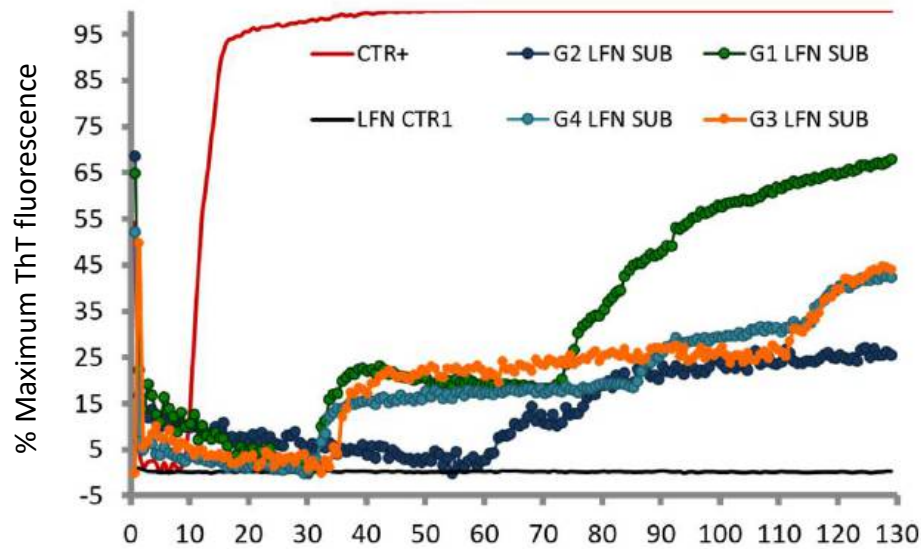


*Encefalo - Pool (4/5)*

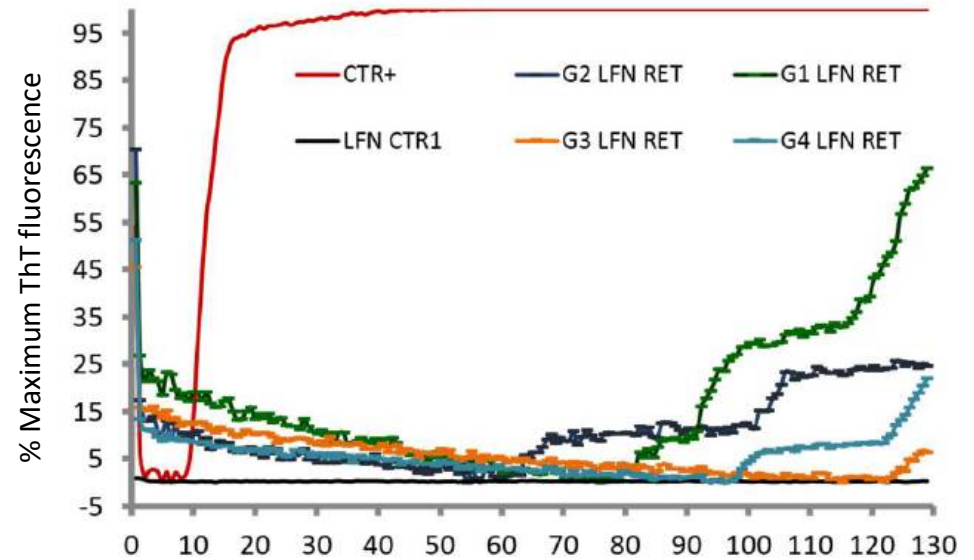
## Trasmissione per via orale: aree di deposizione della PrPSc nel SNC



## Trasmissione per via orale: deposizione della PrPSc nel SLR

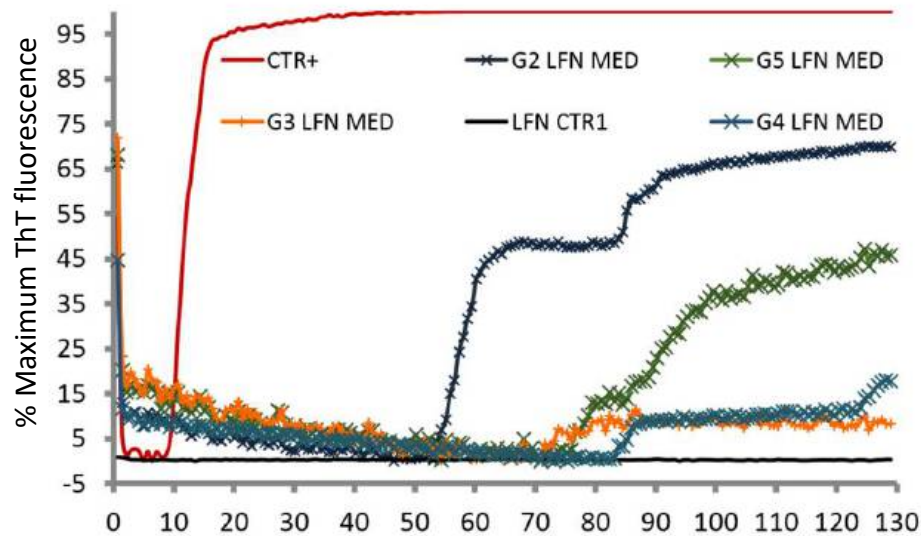


*Lnf. Sottomandibolare 4/4*

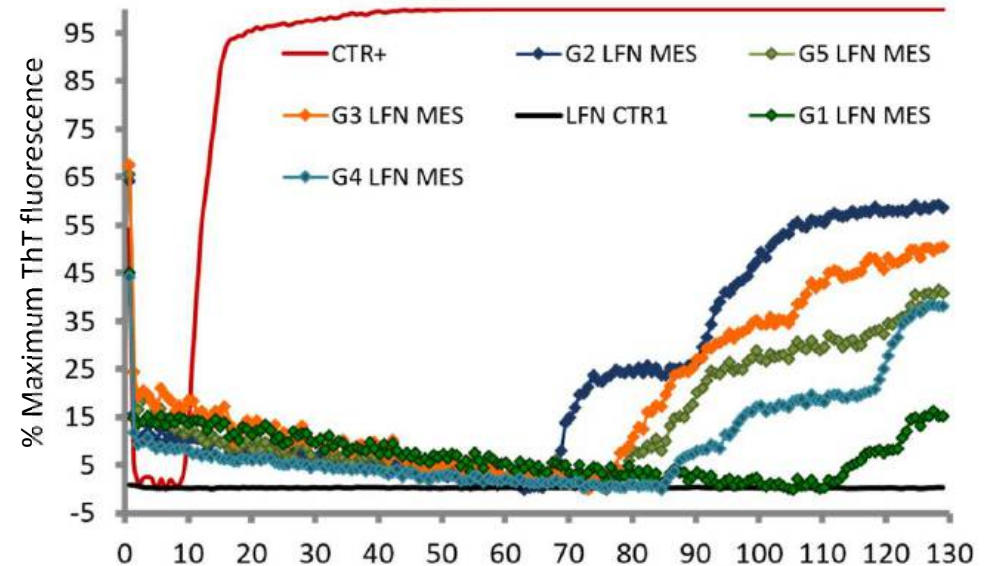


*Lnf. Retrofaringeo 3/4*

## Trasmissione per via orale: deposizione della PrPSc nel SLR

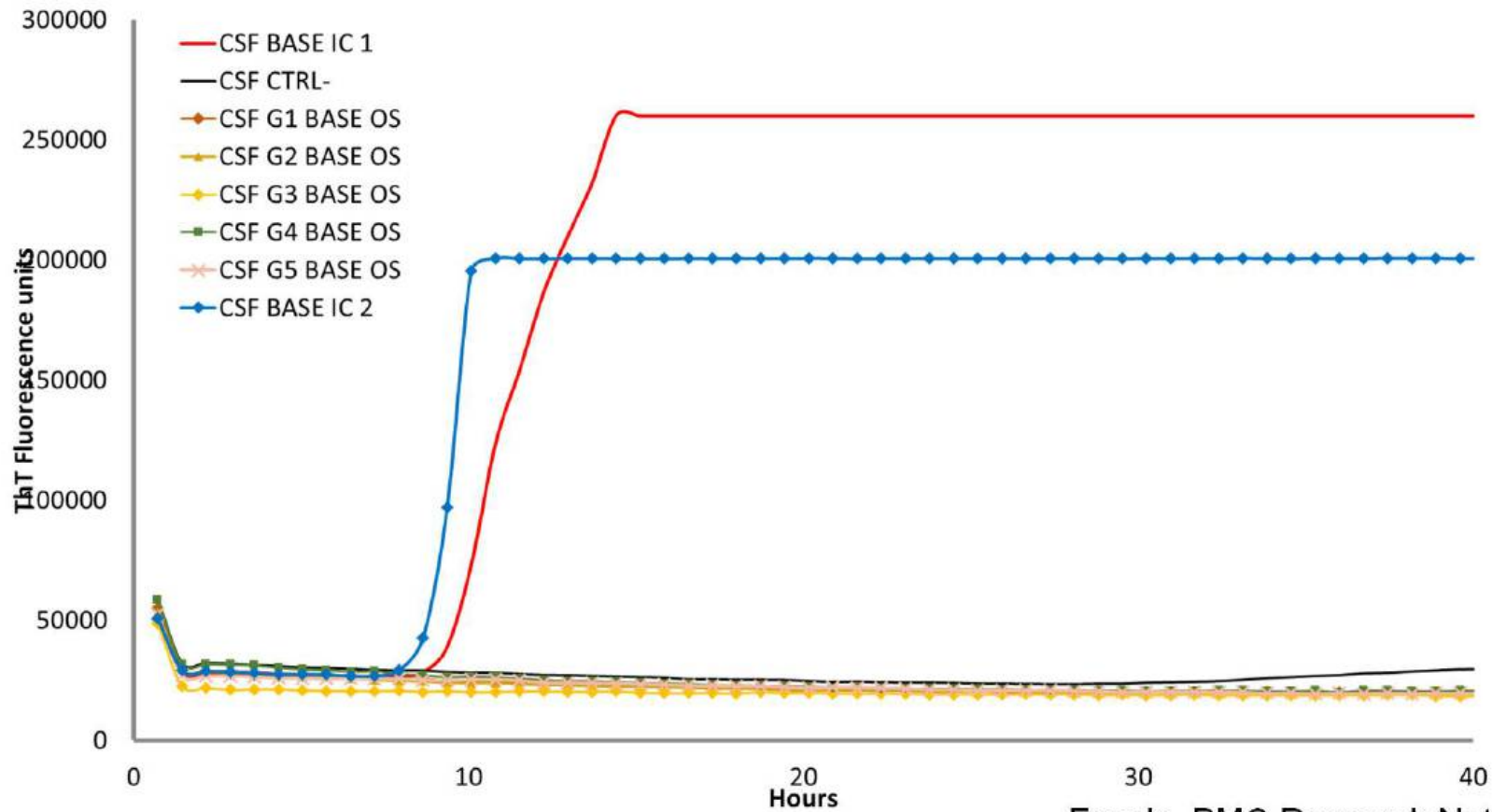


*Lnf. Mediastinici 3/4*



*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](mailto:izsto@legalmail.it) - web: [www.izsplv.it](http://www.izsplv.it)