

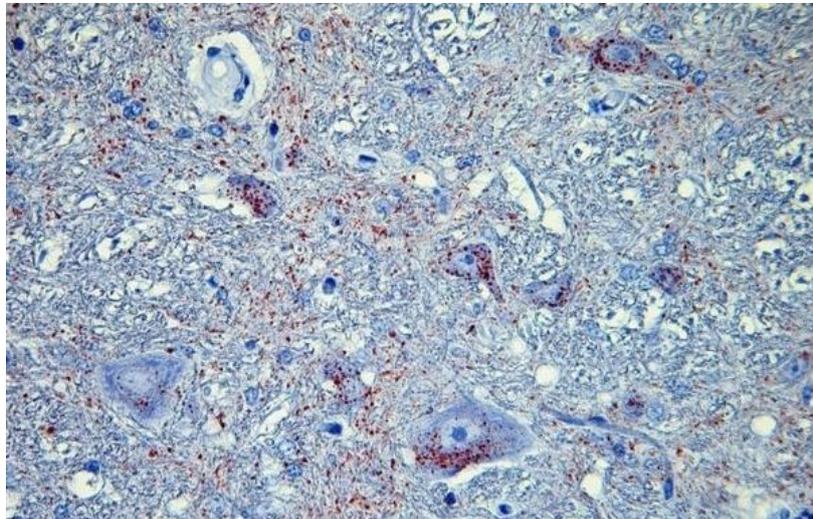


UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



Diagnóstico Preclínico de Scrapie mediante Inmunohistoquímica

Tesis Doctoral



GUSTAVO ADOLFO FARIÁS ROLDÁN

Abril, 2013

TITULO: *Diagnóstico Preclínico de Scrapie mediante Inmunohistoquímica*

AUTOR: *GUSTAVO ADOLFO FARIAS ROLDÁN*

© Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es

ÍNDICE

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	7
2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
<u>Encefalopatías Espongiformes Transmisibles</u>	14
Priones	19
Enfermedades priónicas en humanos	25
Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ).....	26
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS)	31
Kurú	32
Insomnio Familiar Fatal (IFF)	32
Enfermedades priónicas en animales	33
Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	34
Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV)	39
Enfermedad del Desgaste Crónico (EDC).....	40
Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF)	43
Scrapie	45
<i>Epidemiología y distribución geográfica</i>	45
<i>Etiología</i>	49
<i>Patogenia</i>	51
<i>Influencia genética</i>	57
<i>Transmisión</i>	60
<i>Sintomatología</i>	62
<i>Diagnóstico</i>	64
<i>Prevención, control y erradicación</i>	71
<i>Salud pública</i>	74
<i>Situación nacional</i>	76
Situación mundial de las EETs	80
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	85
<u>3.1. Obtención de las muestras</u>	86
3.1.1. Muestreo de tejido linfoide del tercer párpado de ovino_	87
3.1.2. Muestreo de tejido linfoide de mucosa rectal de ovino	87
3.2. Procesado de las muestras.....	88
3.3. Evaluación de la aptitud de las muestras	89
3.4. Detección de la proteína priónica en tejido linfoide de ovinos	90
<u>3.4.1. Inmunotinción</u>	91

3.5. Análisis de las muestras	92
4.- RESULTADOS.....	95
4.1. Obtención de las muestras.....	96
4.2. Evaluación de la aptitud de las muestras de tejido linfoide	96
4.2.1. Aptitud de las muestras de tercer párpado	97
4.2.2. Aptitud de las muestras de mucosa rectal	98
4.2.3. Análisis Estadístico.	100
4.3. Detección de la proteína priónica en tejido linfoide de ovinos.	101
4.3.1. Detección de la proteína priónica en las muestras de tercer párpado	102
4.3.2. Detección de la proteína priónica en las muestras de mucosa rectal.	107
5.- DISCUSIÓN.....	113
6.- CONCLUSIONES.....	127
7.- RESUMEN.....	131
8.- SUMMARY.....	135
9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
10.- AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN	163
11.- ANEXOS	167
12.- INFORME DE LOS DIRECTORES.....	175

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla N°1. Presentación Clínica de las EETs en diferentes especies	14
Tabla N° 2. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en las especies.....	17
Tabla N° 3. Comparación de la PrPC y la PrPSc	21
Figura 1. Diferencia conformacional entre la PrPC y la PrPSc	22
Tabla 4. Estimación del número de casos declarados de scrapie.	59
Figura 3.1. Toma de muestras de tercer párpado	87
Figura 3.2. Fotografía del recto ovino	88
Tabla 5. Estratificación del total de ovinos con muestras de tejido linfoide.....	96
Figura 4.1. Microfotografías de cortes de tercer párpado de ovino.....	97
Tabla 6. Clasificación de aptitud de las muestras de tercer párpado.....	98
Figura 4.2. Microfotografías de cortes de la mucosa rectal de ovino.....	98
Tabla 7. Clasificación de aptitud de las muestras de mucosa rectal.....	99
Gráfico 1. Porcentaje de muestras aptas y no aptas	99
Tabla 8. Clasificación de ovinos, según la aptitud de las muestras.....	100
Figura 4.3. Microfotografías de cortes de tercer párpado.....	104
Figura 4.4. Microfotografías de cortes de óbex de ovinos	105
Tabla 9. Número de muestras aptas según su origen y resultado de IHQ.....	106
Tabla 10. Resumen del número de muestras de tercer párpado.....	106
Figura N° 4.5. Microfotografías de cortes histológicos de la mucosa rectal.....	109
Figura N° 4.6. Microfotografías de cortes histológicos de óbex ovino.....	110
Tabla N° 11. Número de muestras aptas según origen y resultado de IHQ	111
Tabla N° 12. Estratificación del total de ovinos con muestras de tejido	112
Anexo 1. Programa de procesamiento.....	168
Anexo 2. Procedimiento aplicado para la rehidratación.....	168
Anexo 3. Protocolo para la tinción H-E	168
Anexo 4. Procedimiento aplicado para la rehidratación.....	169
Anexo 5a. Registro de las muestras aptas y no aptas para IHQ.	169
Anexo 5b. Registro del número de folículos linfoides según la distancia de corte.....	171
Anexo 6. Análisis Estadístico	174
a) Tabla de contingencia entre la aptitud de la muestra con la distancia de corte.....	174
b) Tabla de contraste de dos en dos entre las distancias de corte.....	174
c) Comparación por pares mediante una prueba U de Mann-Whitney	174

ABREVIATURAS

AEC	3-amino-9-etilcarbazol
CDF	Células dendríticas foliculares
CR	Centro de referencia
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob
EDC	Enfermedad del Desgaste Crónico
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina
EEF	Encefalopatía Espongiforme Felina
EETs	Encefalopatías Espongiformes Transmisibles
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ETV	Encefalopatía Transmisible del Visón
GPI	<i>Glicosilfosfatidilinositol</i>
HCH	Harinas de carne y hueso
H-E	Hematoxilina-Eosina
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFF	Insomnio Familiar Fatal
IHQ	Inmunohistoquímica
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
prión	Partícula proteica infecciosa
PRNP	Gen codificador de PrP
PrP	Proteína priónica
PrP ^C	Proteína priónica celular
PrP ^{Sc}	Proteína priónica scrapie
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SAF	Fibras asociadas a scrapie
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SGS	Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
Sip	<i>Scrapie incubation period</i>
SLR	Sistema linforeticular
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso periférico
TBST	<i>Tris Buffer Saline-Tween 20</i>

TL.....Tejido linfoide
TLAI..... Tejido linfoide asociado a intestino
UE Unión Europea
vECJ..... variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob
WB..... Western blot

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), corresponden a un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales que afectan al humano y a los animales. El scrapie que se produce en los ovinos y caprinos, constituye el prototipo para este grupo de enfermedades. Los primeros indicios de su aparición se remontan a hace más de 250 años en Europa, durante todo este tiempo ha servido como modelo para el estudio de otras EETs en las diferentes especies animales. Tanto el comercio como la exportación del ganado ovino, provocaron una rápida diseminación de la enfermedad, lo que ha llevado a que actualmente se describa prácticamente en todo el mundo, con excepción de Australia y Nueva Zelanda. En Chile hasta la fecha no se ha notificado la presencia de scrapie.

El agente etiológico de las EETs corresponde a una proteína infecciosa denominada prión (PrP^{Sc}), isoforma alterada e infectiva que se origina de una proteína normal constitutiva de la membrana celular (PrP^{C}), que adquiere una conformación estructural anómala con características inusuales como son: su alto grado de insolubilidad lo que le confiere la resistencia a los métodos de inactivación, incapacidad de producir respuesta inmune en el organismo afectado, gran capacidad para convertir la proteína celular en patológica, la que se deposita formando placas amiloides en diferentes órganos, principalmente en el sistema nervioso central (SNC).

El scrapie se caracteriza por presentar prolongados períodos de incubación, en los que los signos clínicos sólo se presentan poco antes de la muerte del animal, lo cual impide realizar un diagnóstico temprano y entorpece las acciones destinadas al control de los enfermos, exponiendo así a los animales que no presentan la enfermedad. Esto implica además, un riesgo para la salud humana por el posible consumo de carnes o subproductos de animales aparentemente sanos, que pudieran estar incubando la enfermedad. Este riesgo adquirió mayor importancia después de que en 1986 se comprobara el paso de la enfermedad a los bovinos, posterior a que éstos fueran alimentados

con harinas de carne y hueso provenientes de ovejas infectadas con scrapie. Las enfermedades producidas por priones han generado mucho interés, después de la epidemia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y el surgimiento de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en el humano, relacionada con la ingesta de alimentos provenientes de vacas infectadas con EEB.

La aparición de los signos clínicos es gradual y su presentación es poco específica, como son el cambio de comportamiento, el prurito y las alteraciones neurológicas. La principal vía de transmisión entre los animales es la oral, aunque también se describe la forma vertical (antes o durante el parto), además de una predisposición genética, que determina una mayor o menor susceptibilidad a manifestar la enfermedad.

Los rebaños infectados con scrapie experimentan fuertes pérdidas en la producción, lo cual afecta negativamente la economía de los países que lo presentan. Este hecho, también puede afectar a los países libres de la enfermedad en los cuales por ejemplo, se limita de sobremanera el espectro de regiones desde las cuales se pueden importar tanto animales como material genético de alta calidad, disminuyendo así su capacidad de mejora productiva.

El ingreso del agente etiológico ocurre principalmente por la vía oral, a través de la cual el príon alcanza el intestino, atraviesa su pared y es amplificado en los tejidos linfoides y nervioso asociado a éste, para posteriormente ser transportado hacia el SNC a través de las fibras de los nervios vago y esplénico. Así se ha detectado la presencia de PrP^{Sc} en tejidos linfoides de ovinos de 14 meses de edad, aproximadamente 6 meses antes del inicio de los signos clínicos, mientras que en el SNC se encuentra en promedio a los 2,5 años.

El alto linfotropismo de algunas estirpes de priones, como las del scrapie, la vECJ y la enfermedad del desgaste crónico, que involucra una acumulación temprana del agente causal en el tejido linfoides, antes de su propagación al

SNC, lo que caracteriza al prión en ovinos y caprinos, representa la base científica para intentar el diagnóstico preclínico del scrapie mediante ensayos de inmunohistoquímica (IHQ), realizados a partir de muestras *ante mortem* del tejido linfoide de tercer párpado, de mucosa rectal o bien de biopsias de tonsilas, antes de que se inicien las manifestaciones clínicas.

Históricamente las EETs han sido diagnosticadas por las características histopatológicas encontradas en el SNC, las que incluyen cambios espongiiformes, gliosis astrocítica y placas amiloides. El examen neuropatológico *post mortem* del cerebro de humanos y animales, continúa siendo la técnica estándar para el diagnóstico de las EETs. La inmunohistoquímica puede ser utilizada para detectar el marcador específico de la enfermedad, la PrP^{Sc} *in situ*, así como también para determinar su distribución en el cerebro y en los tejidos linfoides, basándose en la resistencia que posee el prión frente a la acción de la proteinasa K, en combinación con la detección inmunológica.

La importancia de este estudio apunta a ensayar un sistema de detección eficaz para la proteína priónica patológica en los ovinos, utilizando un tejido como el linfoide, que se ha comprobado que tiene participación en el ciclo de replicación del prión, pero que actualmente no es utilizado en nuestro país como prueba diagnóstica. En Chile la utilización de muestras de cerebro de ovinos muertos, continua siendo la base del diagnóstico para el scrapie, por lo cual la estandarización y utilización del tejido linfoide como muestra apta para IHQ, permitiría implementar y aplicar esta técnica como método preclínico de diagnóstico, que podría ser utilizada para la detección de esta enfermedad *in vivo*, logrando así establecer medidas de control para animales que estén incubando el scrapie y que aún no manifiestan los signos clínicos.

En base a estos antecedentes y las posibilidades futuras en el campo del diagnóstico, la prevención, control y tratamiento de las EETs, se planteó implementar y aplicar en el país esta técnica de detección mediante métodos poco invasivos, que permitan realizar un estudio de la masa ovina sin la

necesidad de esperar la muerte de los animales, estén o no afectados. Es importante remarcar además, la necesidad de contar con herramientas de diagnóstico preclínico para esta enfermedad, más aún cuando la especie ovina se comercializa muchas veces antes de que exista cualquier posibilidad de que se manifieste la sintomatología, debido al largo periodo de incubación que esta puede presentar.

El objetivo central de este trabajo fue el de contribuir al diagnóstico preclínico del scrapie en Chile, a través del estudio inmunohistoquímico del tejido linfoide de ovinos. Para ello nos propusimos por una parte, estandarizar la ubicación anatómica para la obtención de tejido linfoide en muestras de la mucosa rectal de ovinos *post mortem* y determinar la aptitud de la muestra del tejido linfoide, obtenida tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal de ovinos mediante la utilización de la técnica de Hematoxilina y Eosina (H-E), de acuerdo al número de folículos linfoides observados, necesarios para el diagnóstico y por otra, implementar y aplicar la detección inmunohistoquímica de la PrP^{Sc} en ovinos, utilizando tejido linfoide para evaluar scrapie.

En Chile actualmente, como el scrapie no ha sido descrito, los sistemas de vigilancia para esta enfermedad son de tipo pasivo, acotándose al muestreo *post mortem* de cierto número de animales, principalmente de aquellos con sintomatología clínica compatible con scrapie. Para esto, se cuenta con herramientas diagnósticas como son la histopatológica tradicional y la inmunohistoquímica (IHQ). El gran inconveniente de estos métodos diagnósticos es que utilizan muestras de cerebro, por lo que necesariamente deben ser obtenidos *post mortem*. Esto impide detectar la enfermedad en animales que pueden estar incubándola sin presentar síntomas clínicos, impidiendo así su manejo adecuado.

En este trabajo, se buscó implementar, aplicar y estandarizar un método para detectar el scrapie en su etapa preclínica, utilizando la técnica de IHQ en tejido linfoide de tercer párpado y de mucosa rectal de ovinos, en las condiciones del laboratorio oficial del país. Esto permitiría en un futuro cercano, realizar el

diagnóstico en animales vivos y desarrollar estudios conducentes a establecer un estado comprobable de scrapie en la masa ovina nacional.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), también conocidas como enfermedades producidas por priones, corresponden a una de las patologías más intrigantes que afectan el sistema nervioso de los humanos y animales (Collins *et al.*, 2004; Castilla *et al.*, 2005; Farías *et al.*, 2011; Tranulis *et al.*, 2011). Las EETs corresponden a entidades neurodegenerativas de progresión muy lenta, con períodos de incubación muy largos que van entre los 2 a 10 años y siempre son fatales. Desarrollan características histopatológicas como: vacuolización neuronal y del neuropilo, astrogliosis y amiloidosis, las cuales presentan un alto grado de similitud en todas las especies afectadas (Glatzel y Aguzzi, 2001; Aguzzi *et al.*, 2004; Farías *et al.*, 2009).

En su presentación, se reconocen dos fases clínicas: una psíquica, en la cual cambian el comportamiento y temperamento; y otra orgánica, en que se observan alteraciones motoras graves. Hasta ahora no existe tratamiento, por lo que la prevención resulta fundamental (Castilla *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2004; FAO, 2007; Bishop *et al.*, 2010). Entre los signos clínicos y el tipo de enfermedad que producen los priones (Tabla 1), se puede observar que éstos varían de acuerdo a la fase y a la especie afectada (Torres *et al.*, 2001; Aguzzi *et al.*, 2008).

Tabla N°1. Presentación Clínica de las EETs en diferentes especies

	Ovinos	Bovinos	Humanos
Fase Psíquica	Cambios en el comportamiento y temperamento. Prurito que obliga a rascar y frotar el cuerpo.	Aprehensión progresiva. Agresividad.	Modificación del comportamiento y personalidad. Trastornos de la memoria.
Fase Orgánica	Ataxia cerebelar. Pérdida de peso. Temblores y convulsiones.	Descoordinación. Hiperestesia.	Dolores intensos en las extremidades inferiores. Postración. Demencia. Diestesia.

En el transcurso de los últimos 100 años, debido a las EETs, han ocurrido una serie de eventos cuyas consecuencias, tanto en salud pública como en salud animal, han sido muy severas. Es así como el Kuru, en el año 1957, fue el

principal responsable de las muertes en la población de Nueva Guinea. En los últimos 20 años, los bovinos fueron afectados por la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) (Castilla *et al.*, 2002; OIE, 2009), situación que provocó una gran crisis alimentaria a nivel mundial, con severas consecuencias económicas para la Unión Europea, Reino Unido y otros países (Aguzzi *et al.*, 2008; Wadsworth *et al.*, 2011). Además de la transmisión de la EEB a los humanos, por el consumo de productos cárnicos procedentes de bovinos, que ha originado más de 200 casos de una variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) y la posibilidad de que un gran número de personas haya estado expuesto a carne bovina contaminada con priones ha supuesto una gran alarma pública (Vidal *et al.*, 2006; OIE, 2009; Bishop *et al.*, 2010; Norrby *et al.*, 2011).

Mientras en Norteamérica se describen casos de EEB (Dudas *et al.*, 2010) y aumentan sorprendentemente los casos de la Enfermedad del Desgaste Crónico (EDC) (Kong *et al.*, 2005; Dubé *et al.*, 2006; Gilch *et al.*, 2011), en la Unión Europea se ha producido un recrudecimiento de los casos de scrapie (Suecia, Austria, Italia), lo que se relaciona con un aumento en la sensibilidad y la frecuencia de realización de procedimientos de diagnóstico (Aguzzi *et al.*, 2008; Vaccari *et al.*, 2009). Si las EETs se presentan en los animales, producen degeneración lenta y progresiva del sistema nervioso central (SNC) siempre fatales, con cambios histopatológicos característicos (Hur *et al.*, 2002; Aguzzi *et al.*, 2004; Machuca *et al.*, 2006; Watts *et al.*, 2006; Ducrot *et al.*, 2008).

En la medicina humana también existe mayor preocupación, desde que a fines del siglo XX, se describió la transmisión iatrogénica de la ECJ entre los humanos a través del uso de gonadotrofinas contaminadas (Bishop *et al.*, 2010; Norrby *et al.*, 2011). Más recientemente, con la aparición de casos de la vECJ adquiridos a través de transfusiones sanguíneas, en los que se ha observado un aumento en la virulencia de los priones de la EEB al ser transmitidos al humano (Watts *et al.*, 2006; Aguzzi *et al.*, 2008; Terry *et al.*, 2009; Tattum *et al.*, 2010; Orrú *et al.*, 2011), situación que sumada a las EETs en animales, hacen muy necesario el seguir investigando dichas enfermedades.

Inicialmente se postulaba, debido a su transmisibilidad y a los largos períodos de incubación, que las EETs eran producidas por un lentivirus, pero no se logró demostrar la existencia de un virus asociado a la enfermedad, ni tampoco respuesta inmune que avalara este postulado (Collinge, 2005; Norrby *et al.*, 2011). Así se ha aceptado que todas las EETs son causadas por una pequeña partícula proteica infecciosa, carente de ácido nucleico y que recibe el nombre de prión (DeArmond y Prusiner, 1995; Prusiner, 1995; Prusiner, 1998; Brown *et al.*, 2001; Aguzzi y Polymenidou, 2004; FAO, 2007; Hu *et al.*, 2008).

El agente causante de estas neuropatologías es el prión y su mecanismo patogénico es compartido por todas las EETs (Prusiner, 1998; Collins *et al.*, 2004; Aguzzi, 2006; Wadsworth y Collinge, 2007). El prión, corresponde a una forma alterada de la proteína celular normal (PrP^C), que adquiere la capacidad de transformar la forma normal en una variante patológica anormalmente plegada (PrP^{Sc}). Ésta se caracteriza por ser una isoforma menos soluble, capaz de propagarse en el sistema nervioso de un mismo huésped causando una lesión esponjiforme degenerativa en este tejido, además de transmitirse de un huésped a otro con largos tiempos de incubación (Prusiner, 1995; Mabbott y Bruce, 2001; Castilla *et al.*, 2002; Espenes *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010).

Las diferentes formas descritas de las EETs, pueden ser clasificadas como hereditarias, infecciosas y esporádicas (Prusiner, 1995; Bradley, 2002; Farías *et al.*, 2004; Castilla *et al.*, 2005; Ryou, 2007; Heaton *et al.*, 2010). Las de tipo hereditarias, son aquellas provocadas por alteraciones genéticas heredables y su presentación se debe a una mutación en el gen que codifica la proteína priónica (PrP), lo cual termina facilitando el plegamiento erróneo de la PrP^C; las infecciosas o adquiridas, son producto del ingreso al organismo de un prión exógeno que interactúa con la PrP^C, proteína que se transforma en una nueva PrP^{Sc}; las esporádicas, cuando se presentan sin una causa aparente o evidencia de una mutación puntual o de infección exógena por la PrP^{Sc} y cuyo origen en la actualidad no tiene una clara explicación (DeArmond y Prusiner, 1995; Castilla *et al.*, 2002; Watts *et al.*, 2006; Brown y Mastrianni 2010).

Las EETs se han reconocido en diversas especies (Tabla 2), es así como se describen en los humanos donde se destacan la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su variante (vECJ), entre otras (Torres *et al.*, 2001; Aguzzi y Polymenidou, 2004; Davies *et al.*, 2004; Ryou, 2007; Terry *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2010; Wadsworth *et al.*, 2011); mientras que entre las principales de los animales están: el scrapie en ovejas y cabras, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) o “mal de vacas locas (Prusiner, 1995; Fournier y Grigoriev, 2001; Mabbott y Bruce, 2001; FAO, 2003; Brun *et al.*, 2003; Lysek *et al.*, 2004; Hunter, 2007; Vaccari *et al.*, 2009; Lezmi *et al.*, 2010; Tattum *et al.*, 2010).

Tabla Nº 2. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en las especies

Nombre ^(a)	Hospedador	Mecanismo de transmisión	Año reconocido
ECJe	Humano	Espontáneo; mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C a PrP ^{Sc} .	1920
ECJf	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1924
ECJi	Humano	Infeccioso; exposición a equipo quirúrgico infectado con priones; trasplante de tejidos; transfusión sanguínea; terapias con hormona de crecimiento humana.	1974
vECJ	Humano	Infecciosa; exposición a alimentos infectados con EEB.	1996
SGS	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1936
Kuru	Humano (Papua-Nueva Guinea)	Infeccioso; exposición a tejidos contaminados del hombre durante rituales de canibalismo.	1957
IFF	Humano	Genético; mutación heredable en el gen PRNP.	1986
IFs	Humano	Desconocido; espontáneo; mutación somática o conversión espontánea de PrP ^C a PrP ^{Sc} .	1997
scrapie	Ovejas y cabras	Infeccioso; ingestión o contacto con animales, tejidos o secreciones con scrapie; ambiente contaminado; exposición oral.	1732
ETV	Visón	Infeccioso; ingestión de alimento contaminado con priones.	1947
EDC	Ciervo, Alce, ratón	Desconocido; infeccioso, espontáneo; contacto o ingestión con priones.	1967
EEB	Bovinos	Infeccioso; ingestión de alimento contaminado con priones.	1986
EUE	Kudu, Gemsbok Oryx, Nyala, ungulados exótico	Infeccioso; contacto con alimentos o tejidos contaminados con EEB.	1986
EEF	Gatos, tigre, león, puma, chita.	Infeccioso; ingestión de alimento contaminado con priones.	1990

(a) ECJe (Enfermedad de Creutzfeld- Jacob esporádica), ECJf (familiar), ECJi (iatrogénica), vECJ (variante); SGS (Síndrome de Gersmann-Straussler-Scheinker); IFF (Insomnio Familiar Fatal), IFe (esporádico); ETV (Encefalopatía Transmisible del Visón); EDC (Enfermedad del Desgaste Crónico); EEB (Encefalopatía Espongiforme Bovina); EUE (Encefalopatía de Ungulados Exóticos); EEF (Encefalopatía Espongiforme Felina) (Ryou, 2007).

La forma más común y antigua observada de las EETs corresponde al scrapie o “Rascadera” de las ovejas y cabras, presente mundialmente desde el siglo XVIII (Bermejo y Muñoz, 2001; Bozzeta *et al.*, 2004; Vascellari *et al.*, 2007; Vaccari *et al.*, 2009; O`Rourke *et al.*, 2011). En 1920 se describió en humanos la Enfermedad de Creutzfeld-Jacob (ECJ), caracterizada por una demencia de evolución subaguda, asociada a síntomas neurológicos motores. En 1957, Zigas de Australia y Gajdusek de los Estados Unidos describieron el Kuru, en los indígenas Fore de Nueva Guinea, cuyo cuadro clínico afectaba a mujeres y niños, los que presentaban ataxia, temblor y muerte a los pocos años. Lo cual se relaciono con ritos de canibalismo, en que mujeres y niños solían comer el cerebro de los difuntos y los hombres sus músculos (Prusiner, 1995; Bermejo y Muñoz, 2001; Aguzzi, 2006; Caramelli *et al.*, 2006; Brown y Mastrianni, 2010; Norrby, 2011). En el Reino Unido en 1986, Wells y Wilesmith identificaron la EEB, en vacas que comenzaron a presentar descoordinación y a estar inusualmente asustadizas. El origen de esta epidemia emergente, fue localizado en los suplementos alimenticios que incluyeron harinas de carne y hueso provenientes de ovejas muertas por scrapie. Todas estas enfermedades además de alteraciones del comportamiento, tienen en común el presentar alteraciones morfológicas en el tejido cerebral, dándole a este tejido un aspecto de “queso suizo” (Prusiner, 1995; Prusiner, 1998; Bermejo y Muñoz, 2001; Castilla *et al.*, 2002; Aguzzi, 2006; Vidal *et al.*, 2009; Loiacono *et al.*, 2010).

Durante años, la causa de todas estas patologías fue asociada al concepto de “virus lento”, sin embargo a través del tiempo, este concepto fue desestimando puesto que el agente era resistente a tratamientos de inactivación para los virus, junto con la ausencia de reacción inflamatoria. Además, se comprobó que el agente causante de las EETs, no contenía material genético en su estructura (Prusiner, 1995; Prusiner, 1998; Bermejo y Muñoz, 2001; Lysek *et al.*, 2004; Sakudo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011). En la década del 80’, Prusiner y colaboradores reconocieron la naturaleza proteica del agente de las EETs e introdujeron el término de “prión” para denominarlo. De este modo, hoy en día se reconoce mundialmente que la causa de estas enfermedades fatales,

es un patógeno proteínaceo denominado prión, el que carece de ácidos nucleicos funcionales (Prusiner, 1998; Bermejo y Muñoz, 2001; Aguzzi y Polymenidou, 2004; Ryou, 2007; Hu *et al.*, 2008; Sakudo e Ikuta, 2009; Khan *et al.*, 2010).

Priones

Corresponden a pequeñas partículas infecciosas de naturaleza proteica, con propiedades que los hacen más resistentes que la mayoría de las proteínas a la inactivación por métodos físico-químicos. La naturaleza proteica de los priones, se sugirió por su resistencia a la inactivación por procedimientos que destruyen los ácidos nucleicos, como por ejemplo la radiación ultravioleta (Collinge, 2001; Aguzzi *et al.*, 2008; Tixador *et al.*, 2010; Sakudo *et al.*, 2011).

Estas proteínas infecciosas, son una forma alterada de una proteína estructural constitutiva de la membrana celular normal (PrP^C), que es codificada por un gen (PRNP) del brazo corto del cromosoma y que se expresa abundantemente en las células de los mamíferos. Sin embargo, estas isoformas de proteínas priónicas (normal y alterada), tienen propiedades físicas muy diferentes pero tanto animales enfermos como sanos son inmunotolerantes a cualquiera de las isoformas presentes en sus tejidos (Bermejo y Muñoz, 2001; Brun *et al.*, 2003; Ronga *et al.*, 2006; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010)

El gen PRNP, localizado en el cromosoma 20 (humano), que codifica la proteína PrP^C, presenta un único exón para todo el marco de lectura abierto y muestra un elevado grado de conservación en las distintas especies. A pesar de esta característica, las partículas infecciosas procedentes de una especie son muy eficaces para transmitir la enfermedad a cualquier hospedador que tenga el gen de la proteína normal. Así, la eliminación por ingeniería genética del gen PRNP en el hospedador, lo hace resistente frente a la infección por PrP^{Sc} (Glatzel y Aguzzi, 2001; Brun *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2010).

En diversas especies animales se han descrito genes ortólogos de PrP y se ha determinado su *loci* cromosomal. Este gen se expresa ampliamente, con una

gran concentración en las neuronas. Dentro de la célula, la PrP^C es sintetizada en el citoplasma, transportada a través del retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, para ser expuesta en la membrana. En las neuronas, la PrP está concentrada en dominios de la membrana plasmática ricos en lípidos mientras que, la fracción proteica se localiza en la matriz extracelular y se ancla a la membrana por una cadena de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Hur *et al.*, 2002; Kunkle *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Ryou, 2007; Crozet *et al.*, 2008).

La PrP^C es una glicoproteína acoplada a nitrógeno, formada por una cadena polipeptídica de 250 a 260 aminoácidos, dependiendo de la especie. Presenta un único puente disulfuro, dos sitios de N-glicosilación y se encuentra unida a la membrana celular neuronal por una cadena de GPI (Dormont, 2002; Ronga *et al.*, 2006; Yokoyama y Mori, 2008; Sakudo e Ikuta, 2009). Se localiza en los microdominios de membrana ricos en colesterol llamados puentes (*rafts*) o en dominios de caveolina (*caveolae - like*), sin embargo, también se ha detectado en el citosol (Noinville *et al.*, 2008; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008). Tiene una vida media de 5 horas en la superficie celular, después de la cual es incorporada y degradada en compartimentos endolisosomales. Así, la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} ocurre durante el proceso de internalización, como resultado de la conversión de la PrP^C codificada por el hospedador (Fournier y Grigoriev, 2001; Dormont, 2002; Crozet *et al.*, 2008). En su estructura se han descrito, ancladores de membrana, concretamente una unión disulfuro intramolecular (Cys179 - Cys214), que le entrega estabilidad al C-terminal. El sitio de anclaje fue determinado por medio de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y comprende de un dominio globular 121 – 231, que consiste en una pequeña alfa hélice ($\alpha 1$) y dos hélices antiparalelas ($\alpha 2$ y $\alpha 3$) unidas por un puente disulfuro, además de dos láminas beta cortas (Ronga *et al.*, 2006; Aguzzi *et al.*, 2008). Esta estructura de la PrP^C, en diferentes especies de mamíferos, ha mostrado el mismo plegamiento global (Lysek *et al.*, 2004; Aguzzi, 2006; Noinville *et al.*, 2008).

Las dos áreas del dominio globular de la PrP^C se han sugerido como importantes para el desarrollo de las EETs. La hélice α -1 se ha implicado como

un sitio de interacción primaria con la PrP^{Sc}, asociada a las EETs. El epitope compuesto por el *loop* 166 - 172 más el C-terminal y la hélice α -3, han sido sugeridas como de reconocimiento para una chaperona convertidora (Torres *et al.*, 2001; Lysek *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2010). La secuencia amino-acídica y la exposición de modificación en la PrP^C y PrP^{Sc} son idénticas, excepto por su conformación tridimensional, la que establece las diferencias en las propiedades bioquímicas y biofísicas de ambas isoformas (Tabla 3) (Bermejo y Muñoz, 2001; Ryou, 2007; Westergard *et al.*, 2007; Yokoyama y Mori, 2008).

Tabla Nº 3. Comparación de la PrP^C y la PrP^{Sc}

Propiedades	PrP ^C	PrP ^{Sc}
Proteína Priónica	Celular normal	Anormal, asociada a la enfermedad
Infectividad	No infecciosa	Infecciosa, patogénica
Plegamiento	Principalmente α - hélices	Abundante conformación β plegada
Solubilidad	Fácilmente soluble (hidrofílica)	Insoluble (hidrofóbica)
Digestión por Proteasas	Totalmente sensible	Parcialmente, pero resistente
Reactividad de anticuerpos	Alta reactividad principalmente a anticuerpos anti- PrP	No reacciona frente a anticuerpos anti PrP ^(a)

(a) La disponibilidad de anticuerpos específicos de PrP^{Sc} es controversial (Ryou, 2007).

En relación a la conformación de las isoformas (Fig. 1), la PrP^C está compuesta por alrededor de un 40% de α -hélice y 3% de lámina β , mientras que la PrP^{Sc} presenta 30% de α -hélice y 40% de lámina β , en ambas el tamaño es de entre 33 a 35 kDa (PrP 33-35). El aumento del contenido de plegamiento β en la PrP^{Sc}, se debe principalmente a una transición de la conformación entre la región hidrofóbica (aminoácidos 90 a 140) y una porción de las hélices de la PrP^C. Estos eventos moleculares, hacen que la estructura sea hidrofóbica y parcialmente resistente a la digestión por proteinasa K, resultando frente a la acción enzimática una proteína de 27 a 30 kDa (PrP 27-30) (Salguero *et al.*, 2006; Aguzzi *et al.*, 2008). La conformación de la región alterada de la PrP^{Sc}, forma tramos repetidos de cortas hojas β y agregados, para generar multímeros de PrP^{Sc}, que pueden agregarse en fibrillas amiloides. Aún no está claro si estos agregados son los que causan el daño celular o simplemente son un producto subyacente del desarrollo de la enfermedad (Mabbott *et al.*, 1997; Bermejo y Muñoz, 2001; Torres *et al.*, 2001; Ryou, 2007; Khan *et al.*, 2010).

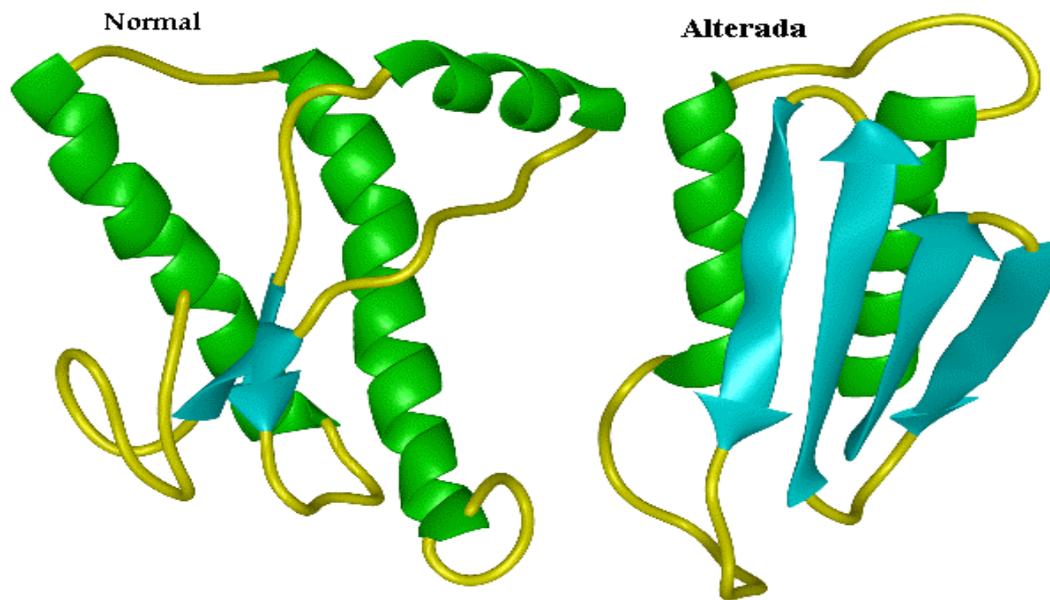


Figura 1. Diferencia conformacional entre la PrP^C y la PrP^{Sc}. Cambio de la proteína priónica normal (PrP^C) que posee mayor cantidad de plegamiento α -hélices, en comparación con la proteína priónica alterada (PrP^{Sc}) que presenta mayor cantidad de láminas β . (http://www.cmpharm.ucsf.edu/cohen/research/gallery/aw_prion.gif).

La PrP^C se expresa abundantemente en el cerebro, sin embargo también ha sido detectada en otros tejidos no nerviosos, tales como el linfocito, pulmón, corazón, riñón, tracto gastrointestinal, músculo y glándula mamaria. Por otra parte, se han descrito algunas posibles funciones fisiológicas para esta proteína, como son: el metabolismo de neurotransmisores, activación de células inmunes, adhesión celular, interacción con la matriz extracelular (puede unirse al precursor del receptor de laminina), transducción de señales (induce una modulación de la fosforilación de la *Fyn kinasa*), metabolismo del cobre y actividad antioxidante, compensando el estrés oxidativo al poder captar cuatro moléculas de Cu^{+2} en el dominio octapéptico repetitivo (residuos 51 a 91 contienen una rara repetición rica en glicina cada ocho residuos), o muerte celular programada, además se describe un posible papel en el ritmo de la actividad circadiana y los patrones del sueño (Mabbott *et al.*, 1997; Mabbott y Bruce, 2001; Dormont, 2002; Aguzzi *et al.*, 2008; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008).

Todas las enfermedades priónicas comparten un mecanismo molecular común, en el que la capacidad infecciosa y patógena de la PrP^{Sc} se debe, muy

probablemente a su conformación anormal, la que genera su depósito cerebral como placas de amiloides insolubles, la resistencia a las proteasas y su capacidad patógena para el SNC (Mabbott *et al.*, 1997; Kunkle *et al.*, 2006; Yokoyama y Mori, 2008; Tixador *et al.*, 2010). La conformación anormal de la PrP, podría ocurrir espontáneamente como un evento raro o frecuente cuando la secuencia de la proteína es alterada por una mutación, o bien, es inducida por un príon infeccioso (PrP^{Sc}). Este cambio en la concepción de la biología tradicional, que dota a una proteína de la capacidad infecciosa (se multiplica), es el gran aporte conceptual de Prusiner (Glatzet y Aguzzi, 2001; Ryou, 2007 Andrievskaia *et al.*, 2008; Pirisinu *et al.*, 2011).

La transmisión es fácil entre los individuos de una misma especie, pero también es posible entre las diferentes especies, aunque con mayor resistencia, así la EEB no se transmite hacia el hamster sin embargo, lo hace fácilmente hacia el ratón. El principal determinante molecular de la barrera entre especies es la homología entre los genes PrP del donador y receptor; y los genes de histocompatibilidad que también podrían jugar un papel en la susceptibilidad al agente de las EETs (Dormont, 2002; Beringue *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2010).

Como resultado de la conversión de la PrP^C gatillada por la “infección” del príon, la mutación del gen PrP, o la forma espontánea (de causa desconocida), se genera la isoforma plegada anormalmente PrP^{Sc}, la cual se acumula progresivamente y se deposita como placas amiloides en el cerebro. Aunque la patogénesis del príon está asociada con la PrP^{Sc}, no está claro cuando ésta adquiere una función tóxica, que le permitan desencadenar los eventos que causan las características patológicas tales como: la neurotoxicidad, el estrés o la muerte celular y la neurodegeneración (Hur *et al.*, 2002; Ronga *et al.*, 2006; Crozet *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2009; Tixador *et al.*, 2010). Algunos estudios sugieren que la PrP^{Sc} puede causar efectos patológicos directos sobre las neuronas o indirectamente a través de células de la glia, gatillando una cascada de signos transduccionales que producen apoptosis. Alternativamente, la pérdida de la función de la PrP^C debido al cambio conformacional, puede resultar en un trastorno en la transducción de señales,

para la supervivencia o protección en las que fisiológicamente participa la PrP^C. La patogénesis de las enfermedades priónicas puede ocurrir por una conformación priónica intermedia formada durante la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} (Noinville *et al.*, 2008; Van Keulen *et al.*, 2008a).

Para la patogénesis de las EETs, se han sugerido dos modelos diferentes para la conversión del prión y su agregación: (a) la polimerización nucleada por condensación no catalítica, donde una PrP^{Sc} multimérica actúa como núcleo de polimerización, la que estabiliza rápidamente muchos monómeros de moléculas de PrP con la incorporación dentro de oligómeros de PrP^{Sc} (Khan *et al.*, 2010). En este modelo, se propone que el cambio conformacional es controlado termodinámicamente y es reversible, pero su equilibrio favorece la conformación de PrP^C. Su conversión es establecida y estabilizada sólo cuando se agrega sobre un núcleo formado por agregados de PrP^{Sc}, el cual favorece aceleradamente la adición de monómeros. De acuerdo a esto, los agregados podrían ser una propiedad intrínseca para la infección; los monómeros de PrP^{Sc} pueden ser inofensivos, pero propensos a generar agregados (Collins *et al.*, 2004; Aguzzi *et al.*, 2008). (b) el heterodímero o conversión asistida por un patrón directo, propuesto por Prusiner, en que los monómeros de PrP^{Sc} sirven como plantilla para convertir a las PrP^C en una forma aberrante, en la interacción entre estas dos moléculas (Ryou, 2007). Así en la infección de una célula hospedador, la conformación alterada de PrP^{Sc} inicia una cascada catalítica, usando a la PrP^C o a un intermediario parcialmente desplegado, como sustrato, convirtiéndolo por un cambio conformacional, en una nueva proteína con un alto porcentaje de plegamiento β . Esta PrP^{Sc} formada, puede transformar a otra PrP^C en una nueva entidad resistente a proteinasa K, así una vez convertidas las PrP^{Sc}, se forman los agregados de priones. Este cambio, puede ser cinéticamente controlado por una barrera de activación de gran energía, que previene la conversión espontánea. Sin embargo, la formación de PrP^C en complejos heteroméricos de PrP^{Sc}, puede tener una barrera de activación de baja energía en la formación de PrP^{Sc}. El desplegamiento ampliado y el proceso de replegado, requieren de la actividad de chaperonas y de energía (Aguzzi *et al.*, 2008). En ambos modelos se hace diferencia en el rol de los agregados de PrP^{Sc} durante la propagación del prión.

Estos agregados no son considerados esenciales para el proceso de conversión asistida por plantilla, pero son indispensables para la propagación en la polimerización nucleada (Torres *et al.*, 2001; Westergard *et al.*, 2007).

Así, la PrP^{Sc} es la resultante de una conformación alterada de la PrP^C, la cual se produce durante el periodo preclínico de la enfermedad. Posterior a este proceso de conversión, la PrP anormal puede unirse a restos de membrana o participar del mecanismo de polimerización, llegando a la formación de estructuras fibrilares. Éstas aparecen en el cerebro como una acumulación de PrP^{Sc}, denominadas placas amiloides (Fournier y Grigoriev, 2001; Caplazi *et al.*, 2004; Salguero *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2010). Es así, que las EETs se caracterizan histopatológicamente por la pérdida neuronal, vacuolización de los cuerpos neuronales y del neuropilo de la materia gris (espongiosis), astrocitosis reactiva y microgliosis (Hamir *et al.*, 2001; Brun *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2004; Crozet *et al.*, 2008). Sin embargo, la causa de esta neurotoxicidad está poco clara, los signos clínicos y la patología que producen variará dependiendo de la especie e incluso de cada animal afectado. En todos los casos, el desarrollo de la enfermedad es lento y los tiempos de incubación con ausencia total de síntomas, son muy largos, 2-10 años, dependiendo de la especie y de los individuos (Torres *et al.*, 2001; Hur *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2004; Hunter *et al.*, 2007; Van Keulen *et al.*, 2008a; Tixador *et al.*, 2010; Farías *et al.*, 2011).

Enfermedades priónicas en humanos

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) humanas son poco frecuentes, siendo la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) la más común, que se presenta en individuos con edades próximas a los 60 años (Vargas *et al.*, 2001; Lasmézas, 2003; Terry *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010).

La mayoría de los afectados por enfermedades priónicas, presentan demencia de progresión rápida y en algunos casos pueden manifestar ataxia de origen cerebelar. Macroscópicamente los cerebros de los pacientes parecen normales, sin embargo la observación microscópica de éstos, en el examen *post mortem*, usualmente deja en evidencia la presencia de degeneración

espongiforme y gliosis astrocítica (Prusiner, 1998; Jeffrey y González, 2007; Manuelidis *et al.*, 2009; Bishop *et al.*, 2010; Tranulis *et al.*, 2011).

En los humanos las EETs pueden ser clasificadas dependiendo del modo de transmisión en tres grupos: infecciosas, esporádicas y hereditarias (Prusiner, 1998; Delgado-Hachmeister *et al.*, 2002; Aguzzi *et al.*, 2004; Aguzzi, 2006; Liberski *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Las enfermedades de estos tres grupos pueden ser transmitidas a los primates por ingestión o inoculación de tejido cerebral, cumpliendo así con una de las características principales de las EETs (Chesebro, 2003; Wadsworth y Collinge, 2007; Barash *et al.*, 2009).

Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (ECJ)

El nombre de esta enfermedad fue introducido por Spielmeyer en 1922, en base a los casos reportados por Creutzfeldt y Jakob en 1920 y 1921 respectivamente, los cuales fueron usados para describir los cuadros clínicos que presentaban características neurodegenerativas (Gambetti *et al.*, 2003; Collinge, 2005; Caramelli *et al.*, 2006; Liberski *et al.*, 2010). Su transmisibilidad fue demostrada por Gajdusek en 1968, en base a estudios experimentales con chimpancés (Aguzzi y Polymenidou, 2004; Bishop *et al.*, 2010). La ECJ comúnmente se presenta a partir de los 60 años de edad, con demencia y pérdida de la coordinación (FAO, 2003; Brown y Mastrianni, 2010). Sin embargo, existen diversas variantes clínicas de esta enfermedad, las cuales se caracterizan por la predominancia de una de sus manifestaciones típicas (demencia, ataxia cerebelar, daño piramidal motor, amaurosis, mutismo acinético) y por las lesiones neuropatológicas de tipo espongiformes de variada intensidad y distribución en el SNC. Además, se describen placas amiloides cerebelares en el 5% de los casos (DeArmond y Prusiner, 1995; Crozet *et al.*, 2008; Manuelidis *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Tranulis *et al.*, 2011).

Según las características etiológicas, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob tiene tres formas clásicas de presentación y una cuarta que fue descrita más recientemente:

a) *ECJ esporádica o clásica (ECJe)*: corresponde a la forma más común de presentación, manifestándose en el 85% a 90% de los casos de enfermedades priónicas humanas. Fue la primera de las variantes descrita por Creutzfeldt y Jakob (Lasmézas, 2003; Bishop *et al.*, 2010). Se presenta en todos los países con una distribución aparentemente al azar, con una incidencia anual de 1 a 2 casos por cada millón de habitantes, afecta a hombres y mujeres (Collinge, 2005; Yang *et al.*, 2010). La etiología de la ECJe es desconocida, aun no existen datos concretos que se refieran a la forma que causa este tipo de presentación esporádica, pero se plantea la transmisión horizontal de los priones entre humanos y/o animales, mutaciones somáticas del gen PRNP, o conversiones espontáneas de la PrP^C en la PrP^{Sc}, como un raro evento estocástico (Wadsworth *et al.*, 2003; Brown y Mastrianni, 2010; Norrby, 2011).

Por otra parte, existe una marcada susceptibilidad genética para este tipo de ECJ, donde el 68% de los casos son individuos homocigotos para el codón 129 de la secuencia aminoacídica de la proteína priónica, el cual codifica una metionina y/o una valina (Will, 2002; Collinge, 2005; Bishop *et al.*, 2010). En la población caucásica el 52% de los individuos es homocigoto para metionina en esta posición, el 36% es heterocigoto y el 12% restante es homocigoto para valina (Gambetti *et al.*, 2003; Sigurdson *et al.*, 2010). Los individuos homocigotos para metionina o valina, están más predispuestos a desarrollar la ECJe (Wadsworth *et al.*, 2003; Caramelli *et al.*, 2006; Tranulis *et al.*, 2011). Las características tanto clínicas como patológicas, son menos variables que en las EETs de origen infeccioso o hereditario. La mayor incidencia para esta forma es entre los 55 a 60 años de edad, con un inicio de los signos que puede ir entre los 50 a 70 años, pero puede presentarse en individuos jóvenes (16 años) o más seniles (80 años). La duración de la enfermedad, definida por el lapso que va desde el primer síntoma a la muerte, es de aproximadamente 4 meses. La muerte en los afectados, ocurre entre los 65 y 69 años (Will, 2002; Collinge, 2005; Sikorska *et al.*, 2009; Brown y Mastrianni, 2010; Bishop *et al.*, 2010).

El inicio del cuadro clínico se caracteriza por una rápida y progresiva demencia, con desórdenes cognoscitivos como confusión, pérdida de memoria y

comportamientos extraños. Esto progresa usualmente a demencia severa, que puede estar asociada a mioclonos, signos cerebelares y asociada a déficit neurológicos multifocales, como disfasia y ataxia, alteraciones de la visión, convulsiones y signos piramidales o extra piramidales (Chesebro, 2003; Bishop *et al.*, 2010). La ECJe es positiva en un 90% al inmunoensayo de la proteína 14-3-3, obtenida de fluido cerebro espinal y se manifiesta en forma típica con complejos trifásicos al electroencefalograma (60-70%) (Will, 2002; Gambetti *et al.*, 2003; Caramelli *et al.*, 2006; Barash *et al.*, 2009; Brown y Mastrianni, 2010).

b) ECJ familiar o hereditaria (ECJf): ocurre en un 10 a un 15% de los casos de Creutzfeldt-Jakob (Lasmézas, 2003; Collinge, 2005; Liberski *et al.*, 2010; Tranulis *et al.*, 2011). Sin embargo, ésta se asocia a una mutación autosomal del gen PRNP. Aunque se han descrito sobre 50 mutaciones, sólo 4 mutaciones puntuales en los codones 102, 178, 200 y 210, siendo la más común en el 200 y las inserciones de 5 o 6 repeticiones de octapéptidos, las que se relacionan con el 95% de los casos. Aun cuando el fenotipo de los afectados se asemeja a los de la ECJe, su presentación comienza a edades más tempranas y su curso clínico es más prolongado (Gambetti *et al.*, 2003; Johnson, 2005; Yang *et al.*, 2010; Capellari *et al.*, 2011).

c) ECJ iatrogénica (ECJi): tiene una frecuencia de un 5% de los casos de ECJ, ocurre ante la exposición accidental del humano a los priones en procedimientos de tipo médico, dental o quirúrgico, como implantes de duramadre e inyecciones de hormona del crecimiento. Menos comunes son el trasplante de córnea y el uso de instrumental neuroquirúrgico contaminado. Estas vías de transmisión, involucran una contaminación cruzada de materiales o tejidos que entran en contacto con el cerebro de los afectados, dando lugar a mayores niveles de infectividad (DeArmond y Prusiner, 1995; Vargas *et al.*, 2001; Chesebro, 2003; Lasmézas, 2003; Will, 2003; Collinge, 2005; Jeffrey y González, 2007; Wadsworth *et al.*, 2008; Terry *et al.*, 2009).

La presentación clínica, está relacionada con la vía de ingreso del prión. Así, las periféricas se relacionan con periodos de incubación largos y la ataxia es el

signo predominante (Wadsworth *et al.*, 2003; Aguzzi, 2006; Barash *et al.*, 2009). Cuando se produce a través del trasplante de córnea o duramadre, los períodos de incubación son cortos (1 a 2 años) y la demencia es el signo más importante (Chesebro, 2003; Wadsworth y Collinge, 2007; Norrby, 2011).

d) *ECJ variante (vECJ)*: en el año 1995, se describe un nuevo tipo de EET humana, la vECJ, como resultado de la transmisión del prión del bovino al humano (Brown *et al.*, 2001; Will, 2002; Andrews *et al.*, 2003; Colchester y Colchester, 2005; Tattum *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011). La presentación de 10 casos, en individuos con un promedio de 29 años de edad y con un cuadro clinicopatológico distinto a la ECJe clásica, hizo que este cuadro fuera denominado como “la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob” (vECJ). Evidencias de laboratorio apoyaron que el origen de la vECJ, sería causada por el mismo agente de la EEB (Will, 2003; Colchester y Colchester, 2005; Beringue *et al.*, 2008; Sigurdson *et al.*, 2010; Wadsworth *et al.*, 2011).

La conciencia pública y la preocupación por las EETs, se acentuaron después de la identificación de la EEB y la evidencia que demostraba que esta era la causa de la aparición de la vECJ, convirtiéndose así en la primera zoonosis de las enfermedades producidas por priones comprobada. Los primeros casos detectados fueron en el Reino Unido en individuos que habían estado en contacto, consumido productos cárnicos o subproductos de origen bovino, contaminados con el agente de la EEB (Brown *et al.*, 2001; Andrews *et al.*, 2003; FAO, 2003; Beringue *et al.*, 2008; Liberski *et al.*, 2010). Siendo éste el mecanismo más probable de transmisión de al ser humano, sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de la transmisión de la vECJ entre humanos, debido a causas iatrogénicas como procedimientos médicos o quirúrgicos (Vargas *et al.*, 2001; Trevitt y Singh, 2003; Terry *et al.*, 2009; Orrú *et al.*, 2011).

La duración del cuadro clínico, es más prolongada si se compara con la ECJe clásica y en promedio alcanza los 13 meses (Will, 2002; Aguzzi, 2006; Mackay *et al.*, 2011). La edad promedio de presentación es de 29 años. La vECJ comienza con síntomas principalmente psiquiátricos, que corresponden a

depresión, ansiedad, insomnio y apatía, para pasar luego de semanas a meses a signos neurológicos caracterizados por un síndrome cerebelar con ataxia y mioclonías. Una minoría de los pacientes presenta signos neurológicos desde el comienzo, que corresponden a dolor persistente y deterioro de la memoria (Will, 2003; Mackay *et al.*, 2011). Más tardíamente, aparecen los problemas de memoria que progresan a desordenes cognitivos y finalmente mutismo. La muerte a menudo ocurre por una infección concomitante que afecta al paciente (Chesebro, 2003; Andrews *et al.*, 2003; Orrú *et al.*, 2011).

La forma neuropatológica de la vECJ es consistente, aunque existen cambios espongiiformes generalizados, gliosis y pérdida neuronal más severos a nivel del tálamo y ganglios basales, la característica más importante es la presencia de abundantes placas amiloides en la corteza cerebral y cerebelar. Éstas corresponden a proteína priónica resistente a proteasa rodeada por vacuolas espongiiformes, dándole un aspecto morfológico de placas multicéntricas o “floridas”. Estas placas sólo se han observado en el scrapie, característica particular e inusual de esta enfermedad priónica (Brown *et al.*, 2001; Collinge, 2001; Chesebro, 2003; Caramelli *et al.*, 2006; Wadsworth *et al.*, 2011).

Los resultados de investigaciones realizadas en ratones transgénicos, demostraron la conexión existente entre la EEB y la vECJ, en base a las siguientes similitudes: la distribución de los depósitos de proteína priónica y los patrones de lesiones en cerebros de ratones y primates, inoculados con homogeneizados de cerebros de bovinos con EEB y de pacientes fallecidos de vECJ; los patrones de glicosilación de ambas proteínas patológicas (Glatzel y Aguzzi, 2001; Trevitt y Singh, 2003; Caramelli *et al.*, 2006; Mackay *et al.*, 2011); los períodos de incubación en roedores inoculados; las similares características de transmisión de ambas enfermedades (Delgado-Hachmeister *et al.*, 2002; Will, 2002; Beringue *et al.*, 2008; Bishop *et al.*, 2010; Capellari *et al.*, 2011).

Por otra parte, tanto las características clinicopatológica como la duración del cuadro clínico, de la vECJ son muy distintas a las de la ECJe, las principales diferencias corresponden a: las edades promedio de muerte para los afectados con la vECJ es de 29 años, para la ECJe es de 66 años de edad (Will, 2002;

Caramelli *et al.*, 2006; Mackay *et al.*, 2011), al examen electroencefalográfico, los pacientes con vECJ no presentan características especiales, en cambio los afectados con ECJe presentan complejos repetitivos trifásicos característicos en el 70%. La detección de la proteína 14-3-3 en el fluido cerebro espinal, es positiva en más del 90% de los ECJe, mientras que para la vECJ solo alcanza al 50% de los casos (Will, 2002; Trevitt y Singh, 2003; Tranulis *et al.*, 2011).

Entre los factores de riesgo más importantes para adquirir la vECJ, se incluyen a individuos jóvenes y homocigotos para metionina del codón 129 presente en el gen PRNP. Así, el 100% de los afectados con vECJ son homocigotos para metionina 129. En el caso de la ECJe, existe un porcentaje de individuos que corresponden a heterocigotos metionina-valina y otros homocigotos para valina para dicho codón (Trevitt y Singh, 2003; Will, 2003; Mackay *et al.*, 2011).

Diversos estudios, han demostrado que el isotipo de la PrP que se deposita en el cerebro de los individuos con vECJ, es similar al de la EEB transmitida y además, que las características “placas floridas” también están presentes en los cerebros de primates inoculados con el príon de la EEB. Además que las características de transmisión, el período de incubación y la distribución de los cambios neuropatológicos, son muy similares para ambas enfermedades, lo cual reafirma la evidencia de un estrecho vínculo entre los agentes causales (Will, 2003; Sikorska *et al.*, 2009; Wadsworth *et al.*, 2011).

Otras enfermedades neurodegenerativas que son producidas por priones en la especie humana corresponden resumidamente a:

Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (SGS): descrita en 1936, como un desorden cerebelar que se presenta entre los 20 a 40 años de edad, por una mutación del gen PRNP. El cuadro clínico se caracteriza por ser progresivo y lento, se manifiesta con ataxia cerebelar progresiva, con paraparesia espástica o bien mioclonos, la demencia se presenta de manera tardía. El curso es de 5 a 11 años, hasta que se produce la muerte. Los

principales cambios patológicos son las placas amiloides del cerebro (Johnson, 2005; Sikorska *et al.*, 2009; Brown y Mastrianni, 2010; Liberski *et al.*, 2010).

Kurú: o “muerte de la risa”, descrita el año 1957 por Zigas y Gajdusek, restringida geográficamente a las tierras altas de Nueva Guinea, en la tribu “Fore” (Collinge, 2001; Will, 2003; Wadsworth y Collinge, 2007; Sikorska *et al.*, 2009). Es una enfermedad rara y letal, caracterizada por pérdida de coordinación y demencia, en la que no existe evidencia de transmisión vertical (Aguzzi y Polymenidou, 2004; Manuelidis *et al.*, 2009; Tranulis *et al.*, 2011). Su origen fue la práctica de canibalismo, que actuó como vehículo para las cepas neuropatogénicas del agente. Inicialmente, el grado de afección en adultos era de 10 mujeres por cada hombre y en niños sobre 5 años de ambos sexos (Collinge, 2001; Will, 2003; Wadsworth *et al.*, 2008). La importancia del Kurú es que no existen otras rutas de transmisión, más que la oral, ya que la interrupción del canibalismo ha significado la desaparición gradual de esta enfermedad, confirmando que el hombre es su huésped terminal (FAO, 2003; Aguzzi, 2006; Sikorska *et al.*, 2009; Norrby, 2011; Wadsworth *et al.*, 2011).

El Kuru afecta a ambos sexos y a individuos entre los 4 a 60 años de edad. El curso tiende a ser más corto en los niños, pero comenzados los síntomas es siempre fulminante y letal. La duración clínica promedio es de 12 meses, con un rango de 3 meses a 3 años (FAO, 2009). La principal característica clínica es la ataxia cerebelar progresiva, la que incapacita a los afectados a los pocos meses; además presentan temblores, rigidez y adelgazamiento progresivo, con cambios cognoscitivos en los estados avanzados (Collinge, 2001; Johnson, 2005; Wadsworth *et al.*, 2008; Manuelidis *et al.*, 2009; Norrby, 2011).

Insomnio Familiar Fatal (IFF): es un desorden del SNC que se presenta con trastornos en el sueño, con insomnio progresivo y alteraciones del sistema nervioso autónomo como disfunción y demencia. Es una enfermedad progresiva que desencadena la muerte en un periodo de 1 a 3 años. Se produce por una mutación en el codón 178 del gen PRNP, producto de una sustitución de asparragina por un ácido aspártico (DeArmond y Prusiner, 1995; Johnson, 2005; Capellari *et al.*, 2011). Las características neuropatológicas,

son la muerte neuronal, que se confina a los núcleos ventral anterior, medio dorsal y olivar del tronco encefálico, donde además puede existir gliosis y ocasionalmente cambios espongiiformes (Prusiner, 1995; Johnson, 2005; Barash, 2009; Brown y Mastrianni, 2010).

Insomnio Fatal esporádico (IFe): es poco frecuente, representando el 2% de los casos de enfermedades por priones de origen esporádico. Fenotípicamente corresponde a la variante talámica de la ECJ y se relaciona con el genotipo metionina-metionina en el codón 129 y la presencia de PrP^{Sc} tipo 2. Clasificación que depende del peso molecular de la PrP^{Sc} posterior al tratamiento con proteinasa K y al residuo en que comienza la porción N-terminal (Gambetti *et al.*, 2003; Wadsworth *et al.*, 2003; Barash, 2009).

La edad promedio de presentación es de 50 años, con un curso de 24 meses (rango de 15 a 53 meses). Clínicamente incluye ataxia, problemas visuales y deterioro cognoscitivo. La mayoría presenta insomnio, demencia y signos motrices como la ataxia, disartria, tremor, mioclonos y espasticidad. Los cambios histopatológicos más importantes se concentran a nivel del tálamo, especialmente en el núcleo medial dorsal y anterior ventral, los que muestran astrogliosis severa y muerte neuronal. La degeneración espongiiforme y la gliosis, es moderada o mínima y se concentra en la corteza cerebral. La astrogliosis y muerte neuronal, es mínima en los ganglios basales y el cerebelo (Gambetti *et al.*, 2003; Johnson, 2005; Barash, 2009; Capellari *et al.*, 2011).

Enfermedades priónicas en animales

Las enfermedades producidas por priones, afectan también a un amplio rango de especies animales, las que podrían ir aumentando al seguir desarrollándose las investigaciones relacionadas con este tipo de enfermedades. A continuación se describen brevemente algunas de las EETs animales más importantes.

Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)

El primer caso de EEB ocurre a fines de 1984 en el Reino Unido, en una vaca lechera que presentaba un comportamiento extraño, con problemas de coordinación en sus movimientos. En 1985 se confirmó que 9 vacas más sufrían el mismo cuadro, con agresividad, hipersensibilidad y ataxia. Al estudiar histológicamente muestras de cerebros de estos bovinos, se observó que el encéfalo tenía la apariencia de una esponja, lo que coincidía con los de ovinos afectados por scrapie. Así, en 1986 se diagnosticó la encefalopatía espongiforme bovina (Bradley, 2002; FAO, 2003; Salguero *et al.*, 2006; Beringue *et al.*, 2008; Dudas *et al.*, 2010; Farías *et al.*, 2011; Stack *et al.*, 2011).

Esta enfermedad es una zoonosis, ya que el prión de la EEB es capaz de producir la vECJ en el humano y además, se ha demostrado su rápida transmisión por vía oral a otras especies, siendo esta la ruta más probable de ingreso en los humanos, puesto que bovinos que incubaban la enfermedad ingresaron a la cadena alimentaria (Smith y Bradley, 2003; Colchester y Colchester, 2005; CRL, 2007; Everest *et al.*, 2011). Desde que fue reconocida en el Reino Unido, surge como amenaza zoonosaria y de salud pública para los sistemas productivos destinados al consumo humano, esto derivó en la adopción de medidas sanitarias a nivel mundial, para proteger la salud humana y animal (Stack *et al.*, 2004; FAO, 2007; Dudas *et al.*, 2010). Así, en el Reino Unido se tomaron medidas extremas, como el sacrificio de los animales infectados (CDC, 1996; Prince *et al.*, 2003; Vidal *et al.*, 2006; Stack *et al.*, 2011), además se eliminaron de la cadena alimentaria todas las vísceras de bovinos que pudieran contener al prión como cerebro, médula espinal, tonsilas, bazo, timo, linfonódulos e intestino (Lasmézas, 2003; Simmons *et al.*, 2011). Puesto que como resultado del consumo de tejidos bovinos contaminados, se observaron EETs derivadas de la EEB en humanos, primates, ovinos, bovinos, ungulados exóticos, felinos domésticos y salvajes (Bradley, 2002; Hamir *et al.*, 2004; DEFRA, 2008; FAO, 2009; Baron *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2011).

Debido a que en el Reino Unido las EETs de ovinos y caprinos son endémicas, la hipótesis más aceptada es que los desechos de ovinos contaminados fueron

la causa inicial de la EEB. También se planteó, que los priones de la EEB se originaron de forma espontánea en los bovinos, de manera que fueron amplificados por el reciclaje de desechos de estos animales; y otra, que indica que el origen de la EEB podría ser una enfermedad priónica humana (Delgado-Hachmeister *et al.*, 2002; Colchester y Colchester, 2005; Vidal *et al.*, 2006; Beringue *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2010; Farías *et al.*, 2011).

Está ampliamente aceptado que el factor determinante en el surgimiento de la enfermedad en los bovinos, se debió a la modificación que sufrió la elaboración de las harinas de carne y hueso (HCH) destinadas a los rumiantes, a fines de la década de los 70`, para reducir los costos de producción. Se supone que la disminución de la temperatura y de la presión, en el proceso de extracción de las grasas, permitió que el prión del scrapie (la base de las materias primas eran ovinas) sobreviviese y llegase a contaminar, a través del consumo de estas harinas, a los bovinos (CDC, 1996; Smith y Bradley, 2003; Torres *et al.*, 2011). Posiblemente la EEB ya existía como una entidad distinta al scrapie antes de los cambios realizados en el proceso y fueron éstos, los que permitieron la adaptación del prión en los bovinos, con lo cual la enfermedad se amplificó y originó el brote descrito (Stack *et al.*, 2004; Konold *et al.*, 2006; Van Keulen *et al.*, 2008b; Stack *et al.*, 2011).

Las HCH fueron incorporadas en las raciones concentradas como un suplemento altamente proteico y con éstas, se alimentó a bovinos y en menor cantidad a ovinos, aún cuando su principal utilización fue en raciones para cerdos y aves de corral. Estas harinas, son el resultado de la conversión del desecho de variadas especies de abasto, incluidos ovinos y bovinos, que no son usadas para consumo humano (Smith y Bradley, 2003; Ducrot *et al.*, 2008). Este procesamiento corresponde al “*rendering*”, procedimiento por el cual los tejidos son procesados para separar las proteínas de las grasas, a través de la cocción de los ingredientes, para luego mediante evaporación, separar la parte sólida de la líquida, la sólida es molida para obtener las HCH (Smith y Bradley, 2003; Novakofski *et al.*, 2005). Estos acontecimientos, no implican que la industria del “*rendering*” haya sido responsable de la diseminación, sino que

ésta se debe a la alta resistencia del agente de la EEB, a la inactivación por los procedimientos convencionales utilizados para los microorganismos (Prince *et al.*, 2003; Taylor y Woodgate, 2003; Ducrot *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2010).

A fines de 1987, se identificó que las HCH fueron el vehículo de la transmisión, después de un estudio epidemiológico (Bradley, 2002; Ducrot *et al.*, 2008). Éste, incluyó un rebaño de cerca de 200 animales afectados, en el que se eliminaron otras etiologías y posibles vehículos exceptuando la alimentación, así sólo quedaron dos posibilidades para esta infección, las HCH y los sebos. La proposición de que fueron las HCH las responsables, se basó en las propiedades físico-químicas del agente del scrapie, las que hacían más probable que éste se separara con la fracción proteica que con los lípidos. Además esto fue respaldado por la variación geográfica de la incidencia de la enfermedad, la cual se adaptaba más a la distribución y manipulación de las HCH, que a la de los sebos (Lasmézas, 2003; Prince *et al.*, 2003; Johnson, 2005). Otra evidencia, fue la mayor incidencia en el ganado bovino lechero más que en el de carne, tendencia que se mantuvo durante toda la epidemia, la que está respaldada por el hecho que los terneros de lechería después de su nacimiento, eran alimentados con suplementos y concentrado que contenían HCH, en cambio los de carne hasta edad más avanzada se alimentaban de forma natural (Smith y Bradley, 2003; Jacobson *et al.*, 2010).

En la década siguiente a la epidemia que afectó al Reino Unido, la EEB se extendió a todo el país a cerca de un millón de bovinos y además la exportación de ganado y de piensos concentrados, diseminó la enfermedad a Europa y otros países del mundo (Lasmézas, 2003; Johnson, 2005). Hasta que en 1988, los derivados de carcasas de rumiantes fueron prohibidos en la alimentación de bovinos en el Reino Unido, se estimó un periodo de 4 a 6 años de incubación en las vacas afectadas y así, 4 años tras la prohibición indicada, los casos llegaron a su punto máximo, comenzando a disminuir en alrededor de un 40% por año posteriormente (Johnson, 2005; Ducrot *et al.*, 2008).

Parece claro que la transmisión en el bovino es por la ingestión de alimentos concentrados contaminados con priones. Aun cuando algunos estudios, proponen un riesgo de transmisión materna, esta vía no tiene significancia. Sin embargo, la transmisión iatrogénica no puede descartarse (Nonno *et al.*, 2003; Stack *et al.*, 2004; Bellworthy *et al.*, 2005; CRL, 2007; Simmons *et al.*, 2011). Así, el principal origen de esta enfermedad estaría en la alimentación de bovinos, específicamente con HCH, elaborada con el reciclaje de tejidos de ruminantes (ovinos y caprinos) afectados por scrapie (Smith y Bradley, 2003; Beekes y McBride, 2007; Jacobson *et al.*, 2010; Stack *et al.*, 2011).

La EEB es una enfermedad neurológica progresiva, subaguda o crónica que implica grandes cambios en el estado mental del animal (Castilla *et al.*, 2002; CRL, 2007; FAO, 2009; Simmons *et al.*, 2011). Los animales afectados se presentan nerviosos y temblorosos, con hiperreactividad a los estímulos externos, características que determinan el nombre común de “vacas locas”. El animal se aleja del grupo o se rehúsa a entrar a la sala de ordeña y a ser ordeñados. Los primeros signos locomotores afectan a los cuartos traseros durante el desplazamiento, cambios que progresivamente se vuelven más notorios (CRL, 2004; Van Keulen *et al.*, 2008b; Konold *et al.*, 2010a; Torres *et al.*, 2011). Las características clínicas más importantes incluyen cambios: en el comportamiento (aprehensión, miedo, sobresaltos excesivos o depresión); sensitivos (hiperestesia o hiperreflexia, temores y mioclonías); motores (ataxia locomotora con hipermetría en los miembros posteriores) y problemas neurovegetativos como sialorrea, hipoquinesia, bradicardia y alteración del ritmo cardíaco. Además pueden manifestar: agresividad, rechinar de dientes, prurito con lamido o rasquidos, pérdida de la condición corporal (en el 75%) y disminución en la producción láctea (en el 50%). A diferencia del scrapie, el prurito no es un signo común de observar (Nonno *et al.*, 2003; OIE, 2004; Konold *et al.*, 2006). Todas estas manifestaciones ocurren en forma progresiva por varias semanas sin respuesta al tratamiento, terminando con la muerte, pero de acuerdo a la complejidad del cuadro y por razones éticas, se efectúa la eutanasia (CRL, 2004; Tatzelt y Schätzl, 2007; Dudas *et al.*, 2010; Konold *et al.*, 2010b; Simmons *et al.*, 2011).

La edad media de presentación para la infección natural es de 42 meses y su período de incubación varía entre 2 a 8 años, con un promedio de 4 a 5 años, por lo que, la enfermedad sólo se manifiesta en los bovinos adultos y de ambos sexos, aunque se han encontrado animales positivos de menor edad (22 meses). El curso clínico de la enfermedad varía entre las 2 semanas a 6 meses (SAG, 2005; Vidal *et al.*, 2006; Jeffrey y González, 2007; DEFRA, 2008).

El diagnóstico de la EEB se puede realizar a través de distintos métodos, como la observación de las características clínicas de la enfermedad, no obstante el examen histopatológico del SNC es lo más adecuado. Aun cuando a la observación macroscópica no existen cambios aparentes, al realizar el examen histopatológico, se observa una morfología no inflamatoria que se caracteriza por la vacuolización neuronal o cambio esponjiforme, la cual es simétrica y bilateral, tanto en los axones como en el cuerpo neuronal, que suele ir acompañada por astrogliosis y amiloidosis cerebral (Debeer *et al.*, 2002; OIE, 2004; Salguero *et al.*, 2006; Crozet *et al.*, 2008). La ubicación anatómica y la severidad de las lesiones cerebrales, son similares en la mayoría de los casos. Los cambios vacuolares son prominentes en los núcleos: del tracto solitario (cerebelo, nervio glossofaríngeo); del tracto espinal 5° par craneal (cerebelo, nervio trigémino); vestibulares (médula, obex); sustancia gris central, colículos mesencéfalos y el hipotálamo (Prince *et al.*, 2003; CRL, 2004; Novakofski *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2006; Konold *et al.*, 2010a,b).

Para el diagnóstico en muestras de tejido nervioso es necesario realizar pruebas inmunoenzimáticas, mientras que para obtener un diagnóstico confirmatorio la prueba a realizar es la inmunohistoquímica (OIE, 2004; Farías *et al.*, 2005; Thuring *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Grassi *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2011).

Puesto que en esta especie, la enfermedad preclínica no puede ser detectada, ya que los métodos de diagnóstico de laboratorio sólo pueden ser realizados *post mortem*, para el trabajo en terreno resulta fundamental, el conocimiento de

los signos clínicos y de los diferentes diagnósticos diferenciales con otras enfermedades como: rabia, cetosis, hipomagnesemia, intoxicaciones, listeriosis cerebral y otras encefalitis, así como neoplasias cerebrales, entre otras, que afectan al sistema nervioso o al músculo esquelético del bovino adulto (FAO, 2003; CRL, 2007; DEFRA, 2008; Konold *et al.*, 2010a).

Encefalopatía Transmisible del Visón (ETV)

Enfermedad rara y poco frecuente que afecta el SNC de visones de criadero. Descrita el año 1947 en Wisconsin y Minnesota Estados Unidos, país que no volvió a presentar casos hasta 1960. Desde entonces se han descrito casos de manera esporádica en granjas donde se explotan estos animales, incluyendo además a Canadá, Finlandia, Alemania y a Repúblicas de la Unión Soviética. Así, el brote más reciente ocurrió en los Estados Unidos en 1985 (Castilla *et al.*, 2002; Farías *et al.*, 2004; FAO, 2007; Liberski *et al.*, 2009).

La ETV, se ha detectado en ambos géneros en animales mayores de 1 año, es clasificada como una enfermedad cerrada, es decir, que a diferencia del scrapie, no posee una vía natural de transmisión, excepto el canibalismo. Sin embargo, estudios epidemiológicos afirman que la fuente de infección es exógena, siendo ésta los alimentos contaminados con priones (FAO, 2003), lo que indicaría que está relacionada con la ingestión de carne contaminada, probablemente de bovinos u ovinos afectados con priones (Sigurdson y Miller, 2003; Lasmezas, 2003; Harrington *et al.*, 2008). En el brote más reciente de Wisconsin 1985, no se evidenció que los visones fueran alimentados con subproductos de ovinos, pero si con los de bovino (FAO, 2007; Ducrot *et al.*, 2008). Puesto que, en los criaderos se incluían en la alimentación, restos de matadero y cadáveres de animales sin tratar, los que habrían estado contaminados con el prión, surgiendo así la posibilidad que la EEB, aún no identificada en sus bovinos, estuviera presente en los Estados Unidos (FAO, 2009; Liberski *et al.*, 2009; Dudas *et al.*, 2010; Farías *et al.*, 2011).

Las investigaciones realizadas confirmaron el traspaso interespecie, en los estudios de inoculación intracerebral de la ETV en bovinos, demostraron cierta

similitud con la EEB en relación al período de incubación, signos clínicos y lesiones histopatológicas, sin embargo la distribución de las lesiones en los animales afectados fue diferente a la observada en la EEB (Williams y Miller, 2003; FAO, 2007; Harrington *et al.*, 2008). Aunque no existe evidencia de que la ETV se desarrolle de manera natural en animales silvestres, ésta ha sido transmitida por inoculación intracerebral a zorrillos y mapaches (Hamir *et al.*, 2004; Crozet *et al.*, 2008; FAO, 2009; Liberski *et al.*, 2009).

La ETV natural, al igual que otras EETs, presenta un largo período de incubación de entre 7 a 12 meses. El cuadro clínico puede durar entre 3 días y 6 semanas, con signos clínicos que poseen un inicio muy sutil y se caracterizan por ser de tipo nervioso. Inicialmente los visones afectados presentan cambios de conducta, que incluyen aumento en la agresividad e hiperestesia, la que progresa a ataxia, temores ocasionales o giros en círculos y mordisqueo compulsivo sobre sí mismos o sobre objetos, somnolencia con poca respuesta a estímulos externos y debilitamiento. Además, se ha demostrado una correlación entre el genotipo y la presentación de enfermedad (Sigurdson y Miller, 2003; Jeffrey y González, 2007; Liberski *et al.*, 2009; Farías *et al.*, 2011). Al examen histopatológico, la característica más sobresaliente, es la extensa vacuolización de la sustancia gris de la corteza cerebelar, cuerpo estriado, cerebro medio y neuropilo (Brun *et al.*, 2003). Adicionalmente se observan los cambios espongiiformes clásicos, la degeneración neuronal y astrocitosis características de las EETs. Las lesiones se desarrollan en la corteza, particularmente en la zona frontal, así como en el cuerpo estriado, tálamo e hipotálamo. Sin embargo, se han encontrado bajas concentraciones infectivas en tejidos extraneurales como intestino, bazo y nódulos linfáticos mesentéricos (Sigurdson y Miller, 2003; FAO, 2007; Liberski *et al.*, 2009).

Enfermedad del Desgaste Crónico (EDC)

Descrita en 1967 en un ciervo mula en cautiverio en Colorado (USA). Es un cuadro neurodegenerativo debilitante que genera una pérdida de peso crónico y fatal. Como hospedadores naturales afecta a ciervos (*Odocoileus hemionus*) y alces (*Cervus elaphus nelsoni*) (Miller y Williams, 2002; Williams, 2005;

Sigurdson, 2008; Sandberg *et al.*, 2010), pero también se ha descrito en otros ungulados domésticos y salvajes como: gran kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), oryx arábigo (*Odocoileus leucoryx*), ciervo de pelo blanco (*Odocoileus hemionus columbianus*), prácticamente todos los casos descritos, han sido de Norteamérica (Torres *et al.*, 2001; Miller y Williams, 2004; Gilch *et al.*, 2011).

Los estudios avalan la presencia de la EDC entre animales salvajes y en cautiverio en 13 estados de Estados Unidos y 2 provincias de Canadá, con una prevalencia sobre un 20% en áreas endémicas (Miller y Williams, 2002; 2004; Sigurdson, 2008; Sandberg *et al.*, 2010). Estos descubrimientos, junto con la alta población de ciervos en los Estados Unidos (estimada en 22 millones), el centenar de cazadores de estos animales, sumado al amplio consumo de carne de ciervo, remarcan el alto riesgo de exposición de los humanos a la EDC (Kong *et al.*, 2005; Dubé *et al.*, 2006; Sandberg *et al.*, 2010; Gilch *et al.*, 2011). Si bien hasta la fecha, no se ha demostrado la relación de esta enfermedad con otras EETs, se mantiene bajo observación por la posibilidad de que se trate de una zoonosis, ya que aun no está plenamente identificado su origen ni su modo transmisión (Williams, 2005; Harrington *et al.*, 2008), más aun si se observa que a pesar de ser una enfermedad de baja presentación, los casos aumentan (Miller y Williams, 2004; Kong *et al.*, 2005; FAO, 2009; Almberg *et al.*, 2011).

La forma en que la EDC se transmite, no se ha descrito en forma exacta, pero los datos recopilados en las epidemias en animales en cautiverio, proveen una fuerte evidencia de que la enfermedad es contagiosa y transmitida vía horizontal directa entre los ciervos y los alces, así la EDC se asemeja más al scrapie que a la EEB. Aun cuando, la exposición indirecta a través del medio ambiente contaminado (pastos, agua y corrales), parecen haber servido como fuente de infección en algunas epidemias (Williams y Miller, 2003; Dube *et al.*, 2006; Sigurdson, 2008; Almberg *et al.*, 2011). Las heces también constituirían un probable vehículo de diseminación del agente al ambiente, así los animales susceptibles pueden ingerir el príon cuando buscan comida, algo común para las enfermedades transmitidas por vía orofecal. La excreción por las heces, se debe al depósito de la PrP^{Sc} a lo largo del tracto digestivo, en tonsilas,

orofaringe y tejido linfoide intestinal de los enfermos. La transmisión materna (antes del nacimiento), si es que ocurre, no juega un rol importante en la epidemiología de la EDC. El príon no ha sido detectado en placentas de alces y ciervos (Williams y Miller, 2003; Miller y Williams, 2004; Gilch *et al.*, 2011).

El período de incubación es de 2 a 4 años, afecta a ambos sexos entre los 2,5 a 7 años de edad, aunque se ha reportado en animales de 17 meses y en otros de más de 15 años (Belay *et al.*, 2004; Sigurdson, 2008; Krumm *et al.*, 2010; AlMBERG *et al.*, 2011). Las manifestaciones clínicas de la EDC incluyen la pérdida de peso progresivo por semanas o meses, apatía, depresión, ataxia y temores de la cabeza, deshidratación, caída de cabeza y orejas, inexpresividad facial, salivación excesiva, rechinar de dientes, dificultad para deglutir, dilatación esofágica y regurgitación con la consiguiente neumonía por aspiración. Además del cambio en el comportamiento, el animal pierde el miedo a los humanos (Williams, 2005; Gilch *et al.*, 2011). Las alteraciones fisiológicas y de comportamiento terminales pueden incluir, polidipsia y poliuria, síncope, pérdida de conciencia, mirada fija, alteración en la postura (ventroflexión de la cabeza), caminar compulsivo e hiperexcitabilidad cuando son manipulados (Belay *et al.*, 2004; Williams, 2005; Sigurdson, 2008; AlMBERG *et al.*, 2011). Los enfermos mueren antes de los 12 meses. En los ciervos en cautiverio, se presenta entre los 2 a 7 años de edad y es altamente transmisible. Se ha descrito una prevalencia sobre el 90% en los ciervos mulas, de plantales en los que la enfermedad ha sido endémica por más de 2 años (Belay *et al.*, 2004; Sigurdson, 2008; Krumm *et al.*, 2010; Gilch *et al.*, 2011).

Al examen *postmortem*, los ciervos en etapa terminal se encuentran notablemente emaciados, con atrofia severa de la grasa, contenido ruminal espumoso mezclado con una gran cantidad de arena y grano, úlceras abomasales y omasales, con menor frecuencia neumonía por aspiración (FAO, 2003; FAO, 2007). Las lesiones histopatológicas características, se encuentran confinadas a la sustancia gris del SNC, el cambio esponjiforme es simétrico y bilateral, con vacuolización intraneuronal y del pericarion, degeneración y muerte neuronal, extensa espongirosis del neuropilo, hiperplasia e hipertrofia

astrocítica y ocasionalmente placas amiloides (Williams, 2005; Alberg *et al.*, 2011). Las lesiones espongiiformes predominan dentro del tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, puente y médula oblongada, como también en el bulbo olfatorio y la corteza. Las severas lesiones en el núcleo supraóptico y paraventricular, donde se produce la hormona antidiurética, podrían ser las responsables de los signos de poliuria y polidipsia. La distribución de las lesiones en ciervos y alces es similar a la de EEB o al scrapie, pero diferente a la de ETV, que predomina en la corteza cerebral y núcleo basal. En la EDC, la lesión histopatológica más consistente a nivel cerebral ocurre en el núcleo motor dorsal del nervio vago, el cual es el primer sitio de acumulación de la PrP^{Sc} (Sigurdson y Miller, 2003; Dube *et al.*, 2006; Sigurdson, 2008; Alberg *et al.*, 2011).

El diagnóstico diferencial para la EDC, debe realizarse con enfermedades hemorrágicas como: la hemorragia epizoótica y la lengua azul, además de intoxicaciones y la enfermedad por un parásito de meninge (*Parelahostrongylus tenuis*) presente en Norteamérica. El diagnóstico definitivo, se logra con técnicas de laboratorio como la histopatología, ELISA, Western blot y la inmunohistoquímica que es confirmatoria, a partir de biopsias de tercer párpado y tonsilas (Miller y Williams, 2002; Williams, 2005; Gilch *et al.*, 2011).

Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF)

Descrita en un gato doméstico del Reino Unido en 1990, siendo ésta la especie más afectada, pero también se presenta en otras especies felinas salvajes, entre las que se encuentran el puma, el cheeta, el ocelote y el tigre, casos que se reportaron durante la epidemia de EEB (Ryder *et al.*, 2001; Lezmi *et al.*, 2003; Salvadori *et al.*, 2007; Lezmi *et al.*, 2010). Solo en 1994 se hizo oficial la existencia de esta encefalopatía espongiiforme que afecta a los felinos (FAO, 2003; Iulini *et al.*, 2008; Bencsik *et al.*, 2009; Krumm *et al.*, 2010).

Se presume que esta enfermedad se adquiere a través del consumo de tejido nervioso de bovino con EEB o en raciones comerciales contaminadas con priones de bovino (Williams y Miller, 2003; Bencsik *et al.*, 2009; Lezmi *et al.*, 2010). Sin embargo, los perros alimentados con raciones comerciales similares

(HCH) no mostraron ser susceptibles a la infección (FAO, 2007; Iulini *et al.*, 2008). En contraste, los grandes félidos salvajes que desarrollaron la EEF en los zoológicos del Reino Unido, fueron expuestos al prión de la EEB, al proveer dietas con carne cruda de bovinos que incluían restos del SNC, en cráneos y vértebras (Williams y Miller, 2003; Hilbe *et al.*, 2009 ; Eiden *et al.*, 2010).

El cuadro clínico, se caracteriza por presentar signos nerviosos progresivos, en que inicialmente existen cambios conductuales (más tímidos o agresivos), y luego aparecen temores musculares, ataxia, hipermetría, sialorrea, dilatación pupilar sin respuesta a la luz e hiperestesia al sonido o al tacto, finalizando con la muerte (Ryder *et al.*, 2001; Salvadori *et al.*, 2007). Se presenta en individuos entre 4 a 9 años de edad (Farías *et al.*, 2004; FAO, 2007; Krumm *et al.*, 2010) y su diagnóstico se ha logrado mediante la inmunohistoquímica, la cual ha revelado la presencia de proteína priónica en cerebro, cerebelo y médula espinal (Torres *et al.*, 2001; FAO, 2009; Hilbe *et al.*, 2009; Lezmi *et al.*, 2010). A través de técnicas inmunodiagnósticas se ha determinado que, al igual que en el scrapie, existe acumulación de PrP^{Sc} en tejidos periféricos, tanto linfocítico como del sistema nervioso autónomo (Lezmi *et al.*, 2003; Iulini *et al.*, 2008; Hilbe *et al.*, 2010; Eiden *et al.*, 2010). Los cambios histopatológicos se encuentran confinados al SNC y se caracterizan por la vacuolización de la sustancia gris del cerebro y la médula espinal, siendo los núcleos basal y geniculado medial del tálamo los más afectados (Ryder *et al.*, 2001; Sigurdson y Miller, 2003; Salvadori *et al.*, 2007; Bencsik *et al.*, 2009; Eiden *et al.*, 2010).

La importancia de esta enfermedad radica tanto en su origen como en el patrón de distribución de la PrP^{Sc}. Al igual que en la EEB, la vía de ingreso sería la oral por el consumo de alimentos contaminados con priones de bovino. Sin embargo, la patogenia es muy similar a la del scrapie, donde la acumulación y distribución de PrP^{Sc} son muy importantes (Lezmi *et al.*, 2003; Iulini *et al.*, 2007; Bencsik *et al.*, 2009; Hilbe *et al.*, 2009; Eiden *et al.*, 2010; Lezmi *et al.*, 2010).

Scrapie

Descrito en el año 1732, es una enfermedad neurodegenerativa que pertenece a las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), que afecta al sistema nervioso central (SNC) de ovinos y caprinos (Hamir *et al.*, 2001; CRL, 2007; DEFRA, 2008; Terry *et al.*, 2011). El término scrapie se refiere al prurito que induce a la frotación y al rascado excesivo, que resulta en la pérdida de lana. El agente causal es la proteína infecciosa denominada prión, que se deposita formando placas amiloides en diferentes órganos, principalmente en el cerebro provocando así alteraciones en el SNC que llevan a la muerte (Vargas, 2001; Kübler *et al.*, 2003; Watts *et al.*, 2006; Aguzzi *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009).

Aún cuando las lesiones de esta enfermedad están restringidas al SNC, su patogénesis implica un etapa primaria de replicación de los priones en los órganos linfoides, seguida de una fase neuroinvasiva (Lasmézas, 2003; Kratzel *et al.*, 2007; González *et al.*, 2008). Así, una de las características más importantes de este tipo de enfermedades, es el tiempo que transcurre entre la exposición al prión y la manifestación de los signos clínicos. El periodo de incubación varía entre 2 a 5 años, con un promedio de presentación de los signos clínicos de 2,5 años. Sin embargo, no más del 5% de los animales de un rebaño, muestran signos de la infección (Belay *et al.*, 2004; Novakofski *et al.*, 2005; Dustan *et al.*, 2008; Maddison *et al.*, 2009; Velayos *et al.*, 2010).

Epidemiología y distribución geográfica

El scrapie ha sido descrito en todo el mundo y afecta a muchas regiones productoras de ovinos. La enfermedad es endémica en muchos países europeos y ha sido descrita en varios países de otros continentes. Sin embargo, Australia y Nueva Zelanda han mantenido una situación de libres de la enfermedad, gracias a rigurosas medidas preventivas. Aun cuando, muchos países basaban su control en un sistema de vigilancia pasiva para determinar la presencia o ausencia del scrapie. Lo ocurrido con la EEB, disipó el concepto de que declararla como una enfermedad reportable, era suficiente para definir el estatus de país libre. A esto se suma, la ausencia de una prueba de

monitoreo preclínico que detecte a todos los animales infectados con scrapie, lo que incapacita a un país para declararse libre de la enfermedad. Por esto, debido a la ausencia de protocolos de vigilancia, el estatus de numerosos países con respecto al scrapie es desconocido. En la Unión Europea (UE), es una enfermedad de declaración obligatoria a partir de 1993 (González, 2002; Gama *et al.*, 2006; Fediaevsky *et al.*, 2008). Pero es poco entendible que para justificar el estar libre del scrapie, se realice sobre la base de una vigilancia pasiva por sí sola y aunque son muchos los factores externos que influyen en los reportes de esta enfermedad, la prevalencia actual continua siendo desconocida en muchos países (Nonno *et al.*, 2003; Mitchell *et al.*, 2010). Estas falencias se vieron ilustradas con el descubrimiento de scrapie en Finlandia por la UE el año 2003, tras realizar un muestreo estadístico de ovinos y caprinos en riesgo (sacrificados de emergencia y muertos en predios), además de los adultos sanos sacrificados para la vigilancia. Otro instrumento activo fue el muestreo dirigido a aquellos animales importados de países afectados por scrapie (Detwiler y Baylis, 2003; Fediaevsky *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2010).

Durante los siglos XVIII y XIX, el scrapie fue descrito en muchas razas de ovejas de Inglaterra y Europa. La diseminación de la enfermedad habría sido a través de la importación de ciertas razas de ovinos, como el Merino. En el siglo XX, el scrapie se diseminó por el mundo, después de la segunda guerra mundial, por el movimiento de ovejas que incubaban la enfermedad. Por ejemplo con la exportación de ovejas Suffolk Británicas y Hampshire Down y el subsecuente diagnóstico de scrapie, en éstas o con las que entraron en contacto (Baylis y McIntyre, 2004; Doherr, 2007; Fediaevsky *et al.*, 2008).

La diseminación de la enfermedad, mediante el movimiento de ovinos infectados en etapa preclínica, ejemplifican la necesidad de contar con medidas preventivas que incluyan requisitos de importación restrictivos y si es posible, contar con pruebas diagnósticas preclínicas. Si el scrapie se introduce a una región, es esencial su rápida detección y eliminación, por lo que los requisitos post ingreso, juegan un papel importante en el establecimiento de la enfermedad. Es así como Australia y Nueva Zelanda, al poseer este tipo de

restricciones, realizaron la despoblación completa de ovinos importados y sus contactos tras la detección, logrando así eliminar la enfermedad, después de su introducción. Esta situación contrasta con la de Canadá y Estados Unidos, donde el scrapie se convirtió en una enfermedad endémica (Detwiler y Baylis, 2003; Mitchell *et al.*, 2010). En Estados Unidos es una enfermedad de denuncia y el *Animal and Plant Health Inspection Service* implementó un programa de certificación de rebaños libres de scrapie desde 1992. Aun así, la prevalencia es del 0,2%, afectando en un 84% de los casos a las razas Suffolk y Hampshire (Novakofski *et al.*, 2005; Loiacono *et al.*, 2010; O'Rourke *et al.*, 2011).

La Organización Mundial de Sanidad Animal, indica que el scrapie posee una mayor distribución en países europeos, entre los que se destacan Alemania, Bélgica, España, Finlandia, Reino Unido e Irlanda. En Asia y África, se ha descrito en varios países y en América, en Canadá, Estados Unidos y Brasil (OIE, 2007; Fediaevsky *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2010). En Chile, se indica que no ha sido descrito, aun cuando es de denuncia obligatoria (SAG, 2008).

En los últimos años, muchos países comunican la ausencia del scrapie, sin embargo, no informan las estrategias de vigilancia realizadas. La actual aparición de la enfermedad en países previamente libres, se atribuye a la importación de ovinos desde países que presentan la enfermedad. Se puede anticipar que en un futuro cercano, alguna forma de vigilancia activa, muy parecida a la realizada para la EEB, deberá ser requerida para poder declarar el estatus de país libre de scrapie (DEFRA, 2004; Doherr, 2007; Mitchell *et al.*, 2010). Contrariamente a la EEB, el scrapie es una enfermedad endémica en donde el agente es transmitido entre las ovejas bajo condiciones naturales. Esto sugiere que el príon del scrapie se disemina horizontalmente, ya sea por contacto directo entre los animales o a través de la contaminación del medio ambiente (Caplazi *et al.*, 2004; Gossner *et al.*, 2006; Seidel *et al.*, 2007; Vascellari *et al.*, 2007; Van Keulen *et al.*, 2008a; Terry *et al.*, 2011).

Debido a la transmisión horizontal y a la persistencia medioambiental del agente, el scrapie es autosustentable. Praderas contaminadas han ocasionado

numerosos brotes de esta enfermedad. En Islandia los intentos de erradicación fallaron, cuando las ovejas sanas fueron reintroducidas en praderas que habían sido mantenidas sin ovinos durante 3 años, demostrando la estabilidad del prión incluso en el suelo. El material infeccioso enterrado, sólo pierde el 50% de su infectividad en 3 años (Aguzzi *et al.*, 2004; Terry *et al.*, 2009; Jacobson *et al.*, 2010). Las vías para la contaminación del ambiente son la saliva, heces, orina o residuos descompuestos de tejidos infecciosos como la placenta. Los priones como el del scrapie, son resistentes a diversos procedimientos de esterilización o inactivación, lo cual favorece las posibilidades de transmisión en condiciones naturales. Así es estable en el suelo, por lo que los animales pueden infectarse por el consumo de alimento contaminado con tierra o mediante la inhalación de polvo contaminado (Seidel *et al.*, 2007; Terry *et al.*, 2011). Incluso se ha demostrado que la transmisión intra-uterina (vertical) también es posible (Tuo *et al.*, 2002; Andreoletti *et al.*, 2002; Caplazi *et al.*, 2004; Doherr, 2007; Maddison *et al.*, 2010; O'Rourke *et al.*, 2011).

Los rebaños infectados experimentan fuertes pérdidas en la producción, lo que afecta negativamente la economía de los países que la presentan. Además, el scrapie también puede afectar a los países libres, en los cuales por ejemplo, limita las regiones de las cuales pueden importar material genético de alta calidad, disminuyendo así su capacidad de mejora genética (Baylis y Mcintyre, 2004; Fediaevsky *et al.*, 2008; Van Keulen *et al.*, 2008b; Monleón *et al.*, 2011).

Los períodos de incubación de la enfermedad son largos y los signos clínicos se presentan sólo poco antes de la muerte, lo que impide realizar un diagnóstico temprano, entorpeciendo las acciones destinadas al control de los enfermos, exponiendo así a los animales sanos. Esto implica un riesgo para la salud humana, por el posible consumo de animales que pudieran estar incubando la enfermedad (Andreoletti *et al.*, 2000; Hamir *et al.*, 2001; Taylor y Woodgate, 2003; Belay *et al.*, 2004; CRL, 2007; DEFRA, 2008).

Etiología

La naturaleza del agente transmisible que produce el scrapie, ha sido debatida durante muchos años. La hipótesis inicial, de que éste debía ser de naturaleza vírica, fue cuestionada por la incapacidad de demostrarlo, identificar la presencia de respuesta inmunológica y porque este agente era resistente a los tratamientos que inactivaban a los ácidos nucleicos y a las nucleasas o a la radiación ultravioleta. Los hallazgos llevaron a pensar, que el agente estaba desprovisto de ácidos nucleicos y que podría estar compuesto solo por proteínas (Prusiner, 1995; Castilla *et al.*, 2005; Westergard *et al.*, 2007).

Esta propuesta obtuvo credibilidad bioquímica, después que estudios de purificación en conjunto con bioensayos y homogeneizados cerebrales, que buscaban medir la infectividad del agente, resultaron en el aislamiento de una glicoproteína resistente a proteasas, designada como proteína priónica (PrP) (Prusiner *et al.*, 1995), que es el mayor componente de la fracción infecciosa, que se acumula en los cerebros y podría formar depósitos amiloides (Collinge, 2005; Tatzelt y Schätzl, 2007; Crotzet *et al.*, 2008; Noinville *et al.*, 2008).

Actualmente se reconoce que el agente causante del scrapie es el prión, que corresponde a una partícula infecciosa de origen proteico, que demostró ser resistente a los tratamientos para modificar a los ácidos nucleicos pero que, disminuye su infectividad cuando es sometido a tratamientos que hidrolizan las proteínas. Así cualquiera sea la vía por la que se produzcan las EETs, siempre involucran una modificación postraduccional de la PrP (Prusiner, 1998; Sakudo e Ikuta, 2009; Baron *et al.*, 2010), que son glicoproteínas de membrana ancladas por una molécula de glicosil-fosfatidil-inositol, que cumplen funciones todavía no bien conocidas, aunque se le atribuyen propiedades antioxidantes, participación en la sinapsis y en rutas de transducción de señales relacionadas con la apoptosis (Vargas *et al.*, 2001; Westergard *et al.*, 2007; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008). La PrP celular (PrP^C), glicoproteína constitutiva de membrana, es la que se convierte en la isoforma patológica (PrP^{Sc}) o prión, a través de un proceso postraduccional en el cual una porción de su estructura secundaria es replegada en hoja β , pasando de un porcentaje normal de 3% a un 43% en la

isoforma patológica. La secuencia aminoacídica de la PrP^{Sc} corresponde a la codificada por el gen para PrP del hospedador en el cual se replicó por última vez. Estudios en ratones transgénicos proponen que la PrP^{Sc} actúa como un molde sobre el cual, la PrP^C es plegada en una nueva PrP^{Sc} por medio de un proceso facilitado por otra proteína. Este cambio estructural, es acompañado de nuevas propiedades físico-químicas que le confieren a la PrP^{Sc} dos características que permiten diferenciarla de la PrP^C, como son la resistencia parcial a la digestión por proteasas y la insolubilidad (Prusiner, 1998; Farías *et al.*, 2004; Aguzzi *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2010). Así, mientras la PrP^C es completamente digerida al ser sometida a la digestión con proteinasa K, la PrP^{Sc} es parcialmente resistente, resultando en una proteína de menor peso molecular (*core* proteasa resistente), de 27-30 kDa, la que presenta incluso mayor contenido de lámina β (54%) y menor contenido de α hélices (21%). Este residuo es infeccioso, capaz de agregarse y formar complejos de amiloides (DeArmond y Prusiner, 1995; Machuca *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2008).

Las características moleculares de los priones, junto al hecho que no poseen ácido nucleico en su estructura, les confieren propiedades tales como la resistencia a la inactivación mediante: nucleasas, radiación ultravioleta, cationes divalentes y tratamientos con psoralenos, iones metálicos quelantes, ácidos (pH 3), hidroxilamina, formalina y proteasas (Taylor y Woodgate, 2003; Hunter, 2007). Por otra parte, estudios experimentales han demostrado que la infectividad de la PrP^{Sc} se ve afectada ante la digestión prolongada de proteasas, tratamientos con úrea, ebullición con dodecil sulfato de sodio (SDS), autoclave a 132°C durante más de 2 horas, por la presencia de solventes orgánicos como el fenol o con hipoclorito de sodio que contenga 2% de cloro disponible durante más de una hora a 20°C para las superficies. Por esto, es muy probable que los instrumentos quirúrgicos que entran en contacto con la PrP^{Sc}, puedan seguir contaminados tras los procedimientos de esterilización habituales. Además los priones, no sufren cambios con las transformaciones cadavéricas, resisten la refrigeración y congelación, e inclusive pueden sobrevivir durante años enterrados en el suelo (Seidel *et al.*, 2007; Benestad *et al.*, 2008; Jacobson *et al.*, 2010; Sakudo *et al.*, 2011; Terry *et al.*, 2011).

Patogenia

La patogénesis de las EETs incluyendo el scrapie, es un proceso dinámico que puede dividirse en 4 etapas fundamentales como son: la infección y replicación periférica, lo que incluye la acumulación del prión en el tejido linfoide; la transmigración desde la periferia hacia el SNC incluyendo el ascenso y la diseminación en la médula espinal y el cerebro, denominada neuroinvasión; la neurodegeneración; y la diseminación centrífuga desde el SNC hacia otros tejidos periféricos, como los músculos (Aguzzi *et al.*, 2004; Hamir *et al.*, 2004; Beekes y McBride, 2007; McGovern y Jeffrey, 2007; Monleon *et al.*, 2011).

Infección y replicación periférica: las EETs son adquiridas desde fuentes externas; la EEB, vECJ y el Kuru son transmitidas a través de la vía oral por alimento contaminado. En contraste el scrapie y la EDC, además de ser transmisibles son contagiosas, bajo condiciones naturales. Así la infección oral o por la piel en la transmisión horizontal o vertical del scrapie, puede ocurrir vía placenta infectada u otros vectores (piel erosionada, carne o animales muertos), los que pueden ser ingeridos o contaminar el suelo durante mucho tiempo tras su desintegración (Andréoletti *et al.*, 2000; Ersdal *et al.*, 2005; Gossner *et al.*, 2006; Kratzel *et al.*, 2007; Jacobson *et al.*, 2010). Además la infectividad oral de los priones, demuestra que la PrP^{Sc} es resistente a ácidos estomacales y a proteasas digestivas e incluso bacterianas en los rumiantes (Novakofski *et al.*, 2005; Seidel *et al.*, 2007; Maddison *et al.*, 2009).

La transmisión de las EETs y específicamente del scrapie, parece ser el resultado de las características inusuales de la PrP^{Sc}. El ser autocatalítica, lo que promueve la conversión de la PrP^C en la isoforma patológica. La gran resistencia a las enzimas intracelulares, intestinales y medioambientales, que resulta en la acumulación de la PrP^{Sc} *in vivo* y su persistencia *ex vivo*. La capacidad de agregación, que se traduce en el daño neuronal y los cambios espongiiformes en el SNC (Novakofski *et al.*, 2005; Kratzel *et al.*, 2007; Van Keulen *et al.*, 2008a; Loiacono *et al.*, 2010; Romero-Trevejo *et al.*, 2010).

Una vez ingerido, el príon cruza la barrera mucosa del intestino, por tres posibles vías. A través de las células M, que están presente en los folículos asociados al epitelio de la mucosa y tonsilas, que transportan macromoléculas y partículas a través del epitelio. Por la acción de enzimas digestivas, que pueden fragmentar al agente en el núcleo infectivo resistente a proteasas. Por medio de células dendríticas, que lo capturan por sus procesos dendríticos insertos en el lumen intestinal (Van Keulen *et al.*, 2002; Beekes y McBride, 2007; McGovern y Jeffrey, 2007; Sunkesula *et al.*, 2010; Velayos *et al.*, 2010).

El tropismo celular de los priones varía entre las especies, pero también depende de la cepa del príon, así son linfotrópicos en el scrapie, la EDC y la vECJ, y lo son menos en la ECJ y la EEB, este hecho determina diferentes vías de replicación periférica. A través de diferentes bioensayos tendientes a dilucidar la diseminación del príon del scrapie hacia el SNC, en que se infectaron ratones por vía intragástrica y ovejas infectadas naturalmente, se confirmó que la replicación se inicia en intestino, mostrando un depósito inicial de PrP^{Sc} en las placas de Peyer y los linfonódulos mesentéricos, así como la aparición temprana de éste en tonsilas palatinas, linfonódulos retrofaríngeos y placas de Peyer del yeyuno caudal e ileocecal, junto con linfonódulos que drenan el tejido linfoide asociado a intestino (TLAI), que son los primeros sitios de replicación donde la PrP^{Sc} puede ser detectada, este evento precede al depósito en otros linfonódulos (Aguzzi *et al.*, 2004; Davies *et al.*, 2004; Espenes *et al.*, 2006; Beekes y McBride, 2007; Romero-Trevejo *et al.*, 2010; Sunkesula *et al.*, 2010;). Las células hematopoyéticas transportan al príon desde el sitio de entrada hacia el sistema linforeticular (SLR), donde se replica y acumula en tejidos como el bazo y linfonódulos, antes de la neuroinvasión del sistema nervioso entérico y del SNC (Hunter, 2003; Kratzel *et al.*, 2007; Benestad *et al.*, 2008; Van Keulen *et al.*, 2008b; Velayos *et al.*, 2010; Monleon *et al.*, 2011).

Las células dendríticas foliculares (CDF) y las mononucleares (principalmente macrófagos) cumplen un papel esencial en la patogenia del scrapie ovino, estas células transportan al príon, desde las células M en el epitelio asociado al folículo hacia los centros germinales de los folículos linfoides. Después de

interactuar con los linfocitos, estas células entran en apoptosis y liberan su contenido, que puede ser fagocitado por macrófagos o infectar a las CDF, las cuales pueden difundir hacia los senos corticales y paracorticales en los linfonódulos que drenan al TLAI. Cuando logran acceder al flujo linfoide eferente y a la sangre, podrían ocasionar una diseminación del prión del scrapie hacia otros tejidos linfoides (O'Rourke *et al.*, 2000; Beekes y McBride, 2007; Romero-Trevejo *et al.*, 2010). Es así como la PrP^{Sc} es transportada desde el intestino hacia órganos linfoides secundarios por las CD intestinales, que se especializan en adquirir antígenos desde los tejidos periféricos. Estas células presentan la PrP^{Sc} a los linfocitos B y T en el tejido linfoide, como a las placas de Peyer del intestino o las CDF del bazo, timo y tonsilas. En estos tejidos el prión se acumula y continua con la conversión de la PrP^C en la isoforma patológica, que se localiza en los centros germinales de estos tejidos linfoides (Andréoletti *et al.*, 2000; Novakofski *et al.*, 2005; Kratzel *et al.*, 2007; McGovern y Jeffrey, 2007; O'Rourke *et al.*, 2011).

Así se ha detectado la PrP^{Sc}, en tejidos linfoides a los 14 meses de edad, mientras que en el SNC se encuentra a los 2,5 años, es decir, más de 6 meses antes del inicio de los signos clínicos. Las tonsilas, el tejido linfoide del tercer párpado, los linfonódulos retrofaríngeos y rectales acumulan PrP^{Sc}, que puede ser detectada tempranamente en el curso de la infección por ensayos con inmunohistoquímica. Esta característica del ciclo biológico del prión en ovinos y caprinos, representa la base para el diagnóstico preclínico del scrapie a partir de muestras de tejido linfoide del tercer párpado o biopsias tonsilares y rectales (O'Rourke *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2002; Sedgmen *et al.*, 2002; Monleon *et al.*, 2004; Espenes *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2008; Monleon *et al.*, 2011).

Neuroinvasión: es la trasmigración que se inicia desde las terminaciones nerviosas del tejido linfoide a través de las vías neuroanatómicas hacia la médula espinal y el cerebro (Andréoletti *et al.*, 2000; Heggebø *et al.*, 2003; Kratzel *et al.*, 2007). Las células dendríticas que pertenecen al sistema inmune, están involucradas en este proceso. Se caracterizan por participar en la formación y mantenimiento de la microarquitectura del linfonódulo y además,

juegan un rol en el atrapamiento y captura del antígeno por medio de receptores Fc y la unión de antígenos opsonizantes hacia receptores del complemento CD₂₁/CD₃₅ que son relevantes para la patogénesis del prión (Mabbot y Bruce, 2001; Aguzzi *et al.*, 2004; McGovern y Jeffrey, 2007).

La expresión de la PrP^C es absolutamente necesaria para el transporte del prión, desde los sitios periféricos hacia el SNC e incluso dentro de éste (Van Keulen *et al.*, 2002; Jeffrey y Gonzalez, 2007; Romero-Trevejo *et al.*, 2010). Los órganos linfoides, que es donde se acumula y replica el prión, en su mayoría son inervados por ramas viscerales del sistema nervioso simpático (SNS). Además las fibras sensitivas del nervio vago, ampliamente distribuidas en el tracto gastrointestinal, se comunican químicamente con CD activadas. Sin embargo, los centros germinales están pobremente inervados y la transferencia del prión del scrapie desde las acumulaciones de PrP^{Sc} en estos sitios, hacia las terminaciones nerviosas del sistema nervioso periférico (SNP) se facilita si la mielinización de los nervios periféricos es reducida o está ausente. Por esto, la zona del folículo linfóide que está inervada por fibras nerviosas terminales desmielinizadas, se propuso como el punto de entrada del prión al SNP, ya que es en esta región donde las CDF están en estrecho contacto con las fibras nerviosas (Heggebø *et al.*, 2003; Monleon *et al.*, 2004; Velayos *et al.*, 2010).

Por otra parte, existen sinapsis vagales eferentes en los ganglios intrínsecos del sistema nervioso entérico (SNE), que inervan numerosos puntos en la pared intestinal, incluyendo la mucosa y submucosa, que se extienden desde la faringe hasta el esfínter anal. De esta forma, el tracto digestivo posee una variedad de sitios y vías posibles para la neuroinvasión, incluyendo las conexiones entre nervios y CDF, entre las CD y el SNP, o la transferencia a través de exosomas (Heggebø *et al.*, 2003; Beekes y McBride, 2007).

El prión asciende retrógradamente vía ganglios autónomos, fibras eferentes del vago y nervios viscerales del intestino, hacia el núcleo motor dorsal en el cerebro y la sustancia gris mediolateral de la médula espinal torácica, respectivamente. Desde estos sitios originales de invasión del SNC, a nivel de

la médula espinal torácica y de la médula oblongada, la infección se propaga, a lo largo de proyecciones neuroanatómicas, siguiendo un orden y en ambas direcciones, ascendente y descendente (Lasmézas, 2003; Kratzel *et al.*, 2007; Sakudo e Ikuta, 2009; Romero-Trevejo *et al.*, 2010; Sunkesula *et al.*, 2010;).

En el SNC la PrP^{Sc} primero es detectable en la médula espinal, luego en el tronco cerebral y posteriormente en áreas cerebrales más altas, su depósito ocurre en los núcleos del tracto solitario y vestibular. Sus niveles aumentan exponencialmente después de la infección y antes del desarrollo de los signos clínicos, una vez iniciados éstos, los títulos de PrP^{Sc} en el tejido linfoide y bazo se estabilizan o disminuyen, pero en etapas más tardías se incrementan en las placas de Peyer (Kubler *et al.*, 2003; Monleon *et al.*, 2005; Espenes *et al.*, 2006; Jeffrey y Gonzalez *et al.*, 2007; Everest *et al.*, 2011).

Neurodegeneración: los priones ejercen su efecto destructivo exclusivamente en el SNC, sin inducir fiebre, leucocitosis o respuesta inmune humoral. La causa de la degeneración es poco entendida, ya que parece improbable que la PrP^{Sc} sea directamente tóxica. Así tejidos que carecen de PrP^C pero que acumulan la PrP^{Sc} permanecen sanos y libres de la enfermedad. Sin embargo, la expresión de la PrP^{Sc} en el citosol es neurotóxica en cultivos celulares y ratones transgénicos (Prusiner, 1998; Collinge, 2001; Ronga *et al.*, 2006; Tatzelt y Schätzl, 2007; Van Keulen *et al.*, 2008a; Velayos *et al.*, 2010).

En la etapa neurodegenerativa se identifican dos fases: una con un requerimiento obligado de la expresión de PrP^C, para que ocurran los cambios conformacionales que origina la PrP^{Sc}, que se agrega formando el amiloide. En la segunda, estos cambios se traducen en daño neuronal y la consecuente disfunción fisiológica del SNC (Tatzelt y Schätzl, 2007; Sakudo e Ikuta, 2009).

La muerte neuronal es la principal causa de los signos clínicos en los desordenes neurodegenerativos, como el scrapie. Entre los mecanismos que los producen se encuentran: el aumento del estrés oxidativo, la disfunción mitocondrial y las alteraciones en el metabolismo del hierro y calcio. Sin

embargo, el cómo se produce la muerte celular en las EETs continúa en discusión. El incremento del calcio en la mitocondria es una característica de la necrosis, que puede conducir a una disfunción mitocondrial en los animales afectados, lo que apoya fuertemente la vía necrótica. También la apoptosis podría ser la vía de muerte neuronal, puesto que los niveles de expresión de las proteínas que la regulan; la Bcl-2 (proteína antiapoptótica) y la Bax (proteína proapoptótica) se encuentran alterados por la infección con scrapie. Esto sugiere que la muerte neuronal en las EETs, se puede producir tanto por la vía necrótica como la apoptótica (Hur *et al.*, 2002; Van Keulen *et al.*, 2002; McGovern y Jeffrey, 2007; Crozet *et al.*, 2008; Sakudo e Ikuta, 2009).

Diseminación centrífuga: el hallazgo que las EETs naturales, se diseminan centrípetamente hacia y centrífugamente desde el cerebro y la médula espinal a través de los nervios periféricos, sugiere que éstas pueden también propagarse por vía nerviosa hacia otros tejidos blancos. Los músculos de los animales constituyen un componente importante en la alimentación humana, por lo cual han sido examinados buscando la presencia de priones. Así se ha descrito la presencia de depósito de PrP^{Sc} en una variedad de músculos incluyendo la lengua, en ratones inoculados intracerebralmente, en hámsteres infectados oralmente y en ovinos enfermos, incluso antes del comienzo de los signos clínicos del scrapie (Casalone *et al.*, 2005; Jeffrey y Gonzalez *et al.*, 2007). Debido a estos hallazgos, se hizo necesario observar si los priones podrían encontrarse en músculos de animales que ingresan normalmente a la cadena de alimentación humana. En el primer estudio publicado en el 2004, se encontraron acumulaciones de PrP^{Sc} en el tejido muscular de ovejas, infectadas naturalmente y en desafiadas oralmente, tanto en la fase preclínica como clínica de la infección (Hamir *et al.*, 2004; Beekes y McBride, 2007).

Un nuevo concepto fisiopatológico para comprender la vía por la que los priones invaden el tejido muscular, postula una diseminación centrífuga desde las neuronas motoras espinales y/o craneales, a través de sus proyecciones eferentes hacia las uniones neuromusculares y desde aquí, postsinápticamente

dentro de las fibras musculares, donde las sensitivas nerviosas pueden proveer una vía adicional para la infección (Hamir *et al.*, 2004; Velayos *et al.*, 2010).

Influencia genética

En la presentación e incidencia del scrapie existe una fuerte influencia genética, que se manifiesta en los diferentes períodos de incubación y que, está asociado a la resistencia o susceptibilidad de presentar la enfermedad. Esto es controlado por un gen denominado Sip (*Scrapie incubation period*), genéticamente congruente con el gen PRNP (que codifica para la PrP) (Ersdal *et al.*, 2005; Vascellari *et al.*, 2005; Hunter, 2007; Vaccari *et al.*, 2009).

En los ovinos, el gen PRNP se localiza en el cromosoma 13, con 3 exones y 2 intrones, con un marco de lectura abierto en el exón 3. Está compuesto por 768 pares de bases, que codifican para un producto proteico de 256 aminoácidos, el cual presenta mutaciones en al menos 13 codones. La presencia de polimorfismos del gen para PrP en los codones: 136, que codifica ya sea para alanina (A) que representa resistencia, o para valina (V) que determina susceptibilidad; en el 154, para arginina (R) de resistencia o histidina (H) de susceptibilidad; y el 171, para R de resistencia, o glutamina (Q) o H asociados a susceptibilidad para scrapie. Así, dependiendo de las combinaciones de haplotipo en estos 3 codones, los animales son considerados como portadores del genotipo priónico clínicamente más resistente de adquirir scrapie, aquellos $A_{136}R_{154}R_{171}/ARR$ y los más susceptibles son el $V_{136}R_{154}Q_{171}/VRQ$, ARQ/VRQ y ARQ/ARQ (Detwiler y Baylis, 2003; Gama *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Vaccari *et al.*, 2009; Heaton *et al.*, 2010; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011).

En general se considera que las mutaciones codificantes para A_{136} y R_{171} confieren alta resistencia y que aquellas que lo hacen para V_{136} y Q_{171} lo hacen más susceptible al scrapie. Mientras los polimorfismos en el codón 154 tienen menor importancia. Así, animales del genotipo homocigoto ARR/ARR son altamente resistentes y aquellos VRQ/VRQ son altamente susceptibles a presentar scrapie clínico. No obstante, el grado de susceptibilidad asociado con V_{136} parece ser dependiente de la raza, es así que en la Lacaune y la Suffolk,

es rara de encontrar o está ausente. Sin embargo, el patrón de resistencia puede ser dependiente de la cepa del prión analizada, de tal manera que los portadores del genotipo AHQ parecen ser más susceptibles a la cepa de scrapie Nor98 (Vascellari *et al.*, 2005; Gama *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007; Loiacono *et al.*, 2009; Maddison *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2010).

Por otra parte, el periodo de incubación del scrapie varía de acuerdo con el genotipo del gen PrP. Así, se describe una relación negativa entre la susceptibilidad de un genotipo y el periodo de incubación de la enfermedad o de la edad al momento de morir. De esta forma, los casos de scrapie con genotipos VRQ/VRQ mueren más jóvenes que los VRQ/ARQ y éstos a su vez más que los ARR/VRQ (Ersdal *et al.*, 2005; Heaton *et al.*, 2010).

De las 12 combinaciones posibles de obtener con estos polimorfismos, sólo 5 parecen ocurrir con relativa frecuencia como son ARR, ARQ, AHQ, ARH y VRQ. Los 5 alelos, se pueden combinar y generan un total de 15 posibles genotipos para PrP en los ovinos (Detwiler y Baylis, 2003; Kunkle *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007). La OIE en el 2003, publicó una tabla con los 15 genotipos asociados a los codones 136, 154 y 171, que se clasificaron de acuerdo al grado de resistencia/susceptibilidad en el marco del Plan Nacional para scrapie de Gran Bretaña (Tabla 4) (DEFRA, 2004; Ersdal *et al.*, 2005; Vascellari *et al.*, 2005; Heaton *et al.*, 2010; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011).

En la tabla 4, se relacionan los genotipos ovinos con el scrapie, que permiten dividirlos en 5 grupos de acuerdo a la susceptibilidad. Así, el A indica a los ovinos genéticamente más resistente a la enfermedad; el B agrupa a los resistentes, pero que requieren de cuidado al ser seleccionados para cruzamientos; el C a los que tienen una pequeña resistencia al scrapie, los cuales pueden ser vendidos y cruzados en ciertos períodos de tiempo; el D agrupa a los que tienen genotipos susceptibles al scrapie, pero que pueden ser cruzados en ciertos programas controlados; y el E indica a los que son genéticamente muy susceptibles a la enfermedad, que no debieran usarse en

cruzamientos y los machos debieran ser castrados e incluso eutanasiados (Detwiler y Baylis, 2003; Johnson *et al.*, 2007; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011).

Tabla 4. Estimación del número de casos declarados de scrapie por millón de ovinos de cada genotipo en Gran Bretaña por año, y grado de resistencia/susceptibilidad asignada por el Plan Nacional para scrapie de Gran Bretaña.

Genotipo	Casos / millón	Clasificación Plan Nacional Scrapie
ARR/ARR	0	A
ARR/AHQ	0,3	B
ARR/ARQ	0,4	B
ARR/ARH	0	B
AHQ/AHQ	5	C
ARQ/AHQ	9	C
AHQ/ARH	0	C
ARH/ARH	2	C
ARQ/ARH	5	C
ARQ/ARQ	37	C
ARR/VRQ	6	D
AHQ/VRQ	0,7	E
ARQ/VRQ	225	E
ARH/VRQ	405	E
VRQ/VRQ	545	E

La posible relación entre el scrapie en los ovinos y la EEB en los bovinos, ha llevado a la UE a establecer programas de reproducción destinados a la selección por resistencia al scrapie, en las razas de ovejas de todos los países miembros. El patrón clásico de resistencia genética que se conoce desde 1990, ha impulsado estos programas con el propósito de incrementar la frecuencia del alelo ARR, en diversas razas de ovejas (Gama *et al.*, 2006; Johnson *et al.*, 2007). Así, se ha logrado seleccionar razas ovinas, para desarrollar líneas genéticas resistentes, como las que poseen el alelo ARR y descartar las más sensibles como la VRQ (Detwiler y Baylis, 2003; Ersdal *et al.*, 2005; Vascellari *et al.*, 2005; Hunter, 2007; Heaton *et al.*, 2010; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011).

En los caprinos, se han descrito polimorfismos para el gen PrP en los codones 21, 33, 49, 142, 143, 154, 168, 220 y 240; de los cuales sólo dos están ligados al scrapie. Un dimorfismo en el codón 142, se asocia a una alteración del periodo de incubación y en el 143 el genotipo HH que puede estar asociado

con la presentación del scrapie natural (Valdez *et al.*, 2003; Seuberlich *et al.*, 2007; Dustan *et al.*, 2008; Vaccari *et al.*, 2009; O'Rourke *et al.*, 2011).

Transmisión

Estudios epidemiológicos y experimentales, sugieren que la diseminación del scrapie en los ovinos ocurre principalmente por transmisión horizontal, ya sea directa o indirectamente, es decir, por contacto entre los animales o por contaminación ambiental. La directa, es observada cuando ovejas infectadas entran en contacto con las sanas, que no han presentado exposición al scrapie. Para que esto ocurra, el agente etiológico debe excretarse y/o secretarse desde un animal infectado. La indirecta, ocurre por la eliminación del prión desde ovinos infectados hacia el medio externo. Así, en la placenta se ha encontrado la PrP^{Sc}, que al ser eliminada al ambiente, representa una de las vías de transmisión horizontal (Andréoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.*, 2002; Detwiler y Baylis, 2003; Vascellari *et al.*, 2007; Maddison *et al.*, 2010; O'Rourke *et al.*, 2011). Por esto, se piensa que la diseminación durante el parto es el factor de riesgo más importante, que puede determinar la transmisión directa hacia los animales que tomen contacto con restos de tejidos eliminados en el parto y además, la indirecta por el contacto con pastos, corrales, graneros, alimentos, agua, camas, suelo u otros, ya que el prión del scrapie sobrevive en el ambiente durante varios años (Seidel *et al.*, 2007; Thomzig *et al.*, 2007; Maddison *et al.*, 2009; Jacobson *et al.*, 2010; Terry *et al.*, 2011).

En los ovinos, la concomitancia con otras infecciones, puede llevar a la acumulación de la PrP^{Sc} en folículos linfoides ectópicos de la glándula mamaria, apuntando a la leche como una vía de transmisión directa (Maddison *et al.*, 2009). La contaminación del suelo en el scrapie se puede producir de diversas formas, desde que se demostró que los priones están presentes en diversos tejidos y fluidos corporales en los animales infectados, éstos pueden pasar al medio ambiente con tejidos como la placenta, las heces, la orina e incluso por la carcasa de animales muertos (Andréoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.*, 2002; Terry *et al.*, 2009). Algunos estudios indican que en el scrapie, los priones se pueden encontrar tanto en las glándulas salivares u otras, como en

la piel de los ovinos infectados naturalmente (Gossner *et al.*, 2006; Seidel *et al.*, 2007; Thomzig *et al.*, 2007; Vascellari *et al.*, 2007; Maddison *et al.*, 2010; Terry *et al.*, 2011).

El scrapie, EEB, EDC y vECJ, representan las formas de EETs naturalmente adquiridas, causadas por la exposición al agente en el medio ambiente donde viven los hospedadores. La mayoría de los casos de estas enfermedades, incluyendo la ETV, son causados por la ingestión de priones e invasión del organismo por vía oral. Esto también es válido para el Kuru y la vECJ, EETs humanas, que se relacionan la primera con canibalismo y la segunda con el consumo de alimentos contaminados con EEB (Miller y Williams, 2002; Will, 2003; Caramelli *et al.*, 2006; Beekes y McBride, 2007; Tranulis *et al.*, 2011).

La ocurrencia del scrapie en áreas afectadas, indica que una contaminación del medio es responsable de su presentación, aumentando la posibilidad de una transmisión cruzada entre las especies. El suelo contaminado es una de las fuentes más probables de material infectivo en la transmisión. Así, los ovinos pueden adquirir el prión mientras pastorean en lugares donde existieron infectados, presentándose los nuevos casos. Esto se produce porque los priones tienen una pronunciada e inusual resistencia a la inactivación química y/o física (Seidel *et al.*, 2007; Jacobson *et al.*, 2010; Sakudo *et al.*, 2011).

Respecto a la transmisión vertical del scrapie, sólo se han planteado mecanismos por los cuales puede producirse, puesto que la PrP^{Sc} no se ha detectado en ovarios ni semen. Aun así, se plantea la transferencia de embriones, sin embargo, la enfermedad se puede producir en corderos tanto de embriones que han sido “lavados” como en los que no, antes de ser transferidos. En estudios que han tratado de separar la exposición *in utero* de la perinatal, las conclusiones son inciertas. En las ovejas infectadas, el embrión, en etapas tempranas no es infectado y se dice que esta transmisión está determinada por el gen PrP polimórfico fetal (Andréoletti *et al.*, 2002; Tuo *et al.*, 2002; Vaccari *et al.*, 2009). En qué punto a partir de la exposición ocurre la infección, continúa investigándose, pudiendo ocurrir durante el parto, en la

ingesta de calostro, por medio de la leche, la exposición física a tejido placentario infectado o por la contaminación del medio, equipamiento o personal (Hunter, 2003; Maddison *et al.*, 2009; Terry *et al.*, 2011).

El scrapie es una enfermedad endémica, el agente se transmite entre los ovinos, puede cruzar la barrera interespecie, al afectar a cabras que comparten el lugar de pastoreo con ovejas infectadas y que, experimentalmente puede ser transmitida a primates, roedores y otras especies (Johnson, 2005; Baron *et al.*, 2010; Jacobson *et al.*, 2010; Everest *et al.*, 2011; O'Rourke *et al.*, 2011).

Sintomatología

Las manifestaciones clínicas del scrapie se presentan en animales entre los 2 a 5 años de edad, siendo rara en menores de 1 año, con un período de incubación en promedio de 1 año (Caplazi *et al.*, 2004; Gavier-Widén. *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006). La edad de aparición de los signos es función del período de incubación y éste a su vez depende del genotipo del animal, de la edad en que ocurre la infección y de la dosis infectiva (González, 2002; Maurer *et al.*, 2005; Jeffrey y González, 2007; DEFRA, 2008; Konold *et al.*, 2010b).

Entre los signos clínicos más importantes se incluyen, largos períodos de incubación de meses a años, con un inicio insidioso y episodios de cambios en el comportamiento, con reacciones nerviosas extremas frente a estímulos sonoros, luminosos y al contacto humano. La pérdida de la condición general, como la pérdida de peso, está presente en la mayoría de los casos, pudiendo progresar hacia la emaciación en etapas avanzadas. El prurito excesivo es característico del scrapie, así como la pérdida de lana y su decoloración. El rasquido del animal, contra los cercos o al morderse el área afectada, en la base de la cola y ocasionalmente en el flanco, origina liquenificación e hiperpigmentación de la piel. El temblor, la ataxia, postración y la muerte, ocurren entre los 2 a 12 meses después del inicio de los signos (Hunter, 2003; Farías *et al.*, 2004; Gavier-Widén *et al.*, 2005; Maurer *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006; CRL, 2007; DEFRA, 2008; Konold *et al.*, 2010b; Farías *et al.*, 2011).

El reconocimiento clínico, es primordial para la correcta implementación de programas de vigilancia, que tiendan a controlar y erradicar al scrapie. La evolución clínica de la enfermedad incluye cuatro etapas diferentes: preclínica, temprana, intermedia y tardía. La observación apropiada de los signos clínicos representativos de estas tres últimas, es importante para el diagnóstico en los animales sospechosos y además, hace posible clasificar la enfermedad sintomática (Maurer *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006; Jeffrey y González, 2007).

La etapa temprana se caracteriza por: hipoestesia de los miembros, llegando a la anestesia en la parte distal de los miembros; alteración del estado mental con signos excitatorios, aunque en algunos animales pueden ser depresivos; cambios de comportamiento como ansiedad y resistencia a la contención y la condición corporal menor a 3 (Bellworthy *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2006).

En la intermedia, se inicia la hiporreflexia de los miembros, más marcada en los pélvicos; arritmias cardíacas en el descanso que desaparece con el ejercicio; prurito y pérdida de lana en el anca y la cola y la aparición del mordisqueo (Gossner *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; CRL, 2007; Konold *et al.*, 2010b).

En la tardía, aparece el tremor dado por contracciones mioclónicas que causan movimientos intermitentes de la cabeza, más evidentes cuando los animales son manipulados; hiperexcitabilidad a estímulos externos tales como el acercarse o los ruidos, a los que responden con temor o escape. En el estado final, muestran signos depresivos como la postración, el decúbito lateral permanente, ataxia o anormalidad en la postura, hipermetría en los miembros anteriores y el salto de los posteriores. En la progresión, existe ataxia de los miembros pélvicos, que se generaliza, pérdida del equilibrio, caídas, dificultad para levantarse y finalmente postración completa. También se observa rechinar de dientes (Vargas *et al.*, 2006; Jeffrey y González, 2007).

En base a estas 3 etapas y los signos asociados, se construyó una tabla clínica evaluativa (*clinical index*, CI) en que se asigna una puntuación de 1 a cada signo que se presente, el cual se debe multiplicar por un factor de 1, 2 o 3, de

acuerdo a la etapa en que ese signo es representativo (Hamir *et al.*, 2001; DEFRA, 2008).

Sin embargo, existe una diversidad de presentaciones y de predominios de signos clínicos descritos en poblaciones, razas o incluso en animales muy diferentes. La progresión del cuadro es también muy variable, oscilando desde unos pocos días hasta varios meses. El diagnóstico a nivel individual resulta difícil cuando se desconoce el estado de los rebaños y las enfermedades con que se debe diferenciar. Entre otras: ectoparasitismo, enfermedad de Aujeszky o pseudorabia, rabia, listeriosis, Maedi visna, enterotoxemia, hipomagnesemia, toxemia de la preñez, intoxicación por plantas y productos químicos (González, 2002; Maurer *et al.*, 2005; Jeffrey y González, 2007; Konold *et al.*, 2010b).

En caprinos, la información disponible de la presentación clínica del scrapie es limitada. Se describe inquietud e hiperexcitabilidad ante cualquier estímulo externo, pérdida de peso y de la condición corporal, tremor y ataxia. Pero, difieren en la presentación del prurito, ya que utilizan más sus miembros posteriores que el frotarse, para rascarse (Detwiler y Baylis, 2003; Seuberlich *et al.*, 2007; Vaccari *et al.*, 2009; Konold *et al.*, 2010b; Farías *et al.*, 2011).

Diagnóstico

Dada la naturaleza del agente etiológico del scrapie y a la ausencia de métodos diagnósticos que consigan aislar al prión *in-vitro*, éste se debe realizar en base a la identificación de la PrP^{Sc} y a la observación de los cambios patológicos que provocan en el tejido nervioso del afectado (Detwiler y Baylis, 2003; Machuca *et al.*, 2006; Loiacono *et al.*, 2010; Velayos *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011).

Así, el diagnóstico se basa en la detección de los signos clínicos compatibles, seguido de la aplicación de técnicas histopatológicas e inmunológicas realizadas en muestras de tejido nervioso. Por la desigual distribución de los priones en el organismo, existen bajas concentraciones en fluidos como sangre y orina, el diagnóstico de laboratorio es difícil (Kübler *et al.*, 2003; Monleón *et al.*, 2004; Andrievskaia *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2009; Orru *et al.*, 2011).

Para que los métodos diagnósticos sean útiles, éstos deberían identificar los casos tempranamente durante la patogénesis. En las EETs de los animales y más aún en los destinados al consumo humano, se establece la necesidad de determinar los priones en los animales asintomáticos y antes de la aparición de cualquier signo. Las pruebas diagnósticas comerciales están basadas en la inmunodetección de la PrP^{Sc} y en la remoción proteolítica previa de la PrP^C endógena (Aguzzi *et al.*, 2004; Kunkle *et al.*, 2006; Monleón *et al.*, 2011).

Históricamente la forma de diagnosticar las EETs era por las características histopatológicas del SNC, así el examen neuropatológico *post mortem* del cerebro de animales y humanos, es una técnica estándar para su diagnóstico. Las alteraciones patológicas, corresponden a lesiones neurodegenerativas que incluyen la presencia de vacuolas en el interior del pericarion neuronal, cambios espongiiformes en el neuropilo de la materia gris, pérdidas neuronales, gliosis astrocítica y placas amiloides. Éstas últimas, son estructuras eosinofílicas que rodean a los vasos sanguíneos, con un margen fibrilar característico y son inmunoreactivas a anticuerpos anti-PrP (Kübler *et al.*, 2003; Valdez *et al.*, 2003; Monleón *et al.*, 2005; Machuca *et al.*, 2006; Farías *et al.*, 2009; Sakudo e Ikuta, 2009; Vidal *et al.*, 2009; Velayos *et al.*, 2011).

Las lesiones vacuolares en el scrapie, siempre se presentan simétricas y bilateral, pero su distribución depende de la cepa del prión y del genotipo del ovino. En el scrapie típico, las vacuolas se concentran en el tronco cerebral, a nivel del óbex, que contiene las áreas específicas para el diagnóstico histopatológico, como son los núcleos del tracto espinal del trigémino, del tracto solitario y el dorsal del vago. Sin embargo, se debe tener la precaución en la interpretación de las lesiones puesto que, la autólisis *post mortem*, retrasos en la fijación, inadecuados procesamientos y manipulación de los tejidos, pueden llevar a la vacuolización artificial de las muestras (Debeer *et al.*, 2002; Kübler *et al.*, 2003; Gavier-Widen *et al.*, 2005; Machuca *et al.*, 2006; Dustan *et al.*, 2008).

Para detectar el marcador específico de la enfermedad, la PrP^{Sc} *in situ*, así como también su distribución en el cerebro y en los tejidos linfoides durante su patogenia, se dispone de un grupo de técnicas diagnósticas que se denominan moleculares y que permiten diferenciar la PrP^{Sc} de la PrP^C en muestras de tejido, basándose en la resistencia del prión frente a la acción de la proteinasa K, en combinación con la detección inmunológica del núcleo resistente o PrP 27-30 (Debeer *et al.*, 2002; Salguero *et al.*, 2006). Así, los inmunoensayos han adquirido gran importancia, ya que ofrecen mayor sensibilidad y especificidad en los resultados, entre estos el *ELISA* y el *Western blott*, en tejidos congelados y la inmunohistoquímica (IHQ), en cortes fijados en formalina. La gran ventaja de la IHQ es que detecta la presencia de la PrP^{Sc} y además, determina su distribución en el cerebro o tejido linfoide (Kübler *et al.*, 2003; Gavier-Widen *et al.*, 2005; Monleón *et al.*, 2005; Machuca *et al.*, 2006; Dustan *et al.*, 2008; Grassi *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009; Monleón *et al.*, 2011).

La IHQ es más efectiva que la histopatología para el diagnóstico del scrapie, puesto que se observa el inmunomarcado de la PrP^{Sc}, el que se corresponde con la distribución de los cambios vacuolares. Así, se describen diversos patrones inmunohistoquímicos como son: los de tipo extracelular, asociados a astrocitos, al neuropilo o a células endodiales y endoteliales; y los intracelulares ya sea neuronales y/o gliales (Debeer *et al.*, 2002; Gavier-Widen *et al.*, 2005; Dustan *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2009; Velayos *et al.*, 2010).

El diagnóstico rutinario del scrapie, está limitado al examen clínico y *post mortem* de los animales, mediante la utilización de la técnica de IHQ en muestras de tejido cerebral los con signos clínicos. Posterior al diagnóstico positivo, se deben tomar las medidas de control, las que incluyen el sacrificio o cuarentena de los animales en riesgo, debido a la susceptibilidad genética y/o los que pudieron tener contacto con los infectados (O'Rourke *et al.*, 2002; Vascellari *et al.*, 2005; Kunkle *et al.*, 2006, Loiacono *et al.*, 2010).

El alto linfotropismo de algunas cepas de priones, como las del scrapie, la EDC y la vECJ, junto con la acumulación de la PrP^{Sc} en este tejido, en ovinos,

caprinos, ciervos y alces, antes de la aparición de los signos clínicos, han permitido el uso de la IHQ en muestras de tejido linfoide, para realizar la detección preclínica (O'Rourke *et al.*, 2000; Monléon *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; O'Rourke *et al.*, 2011). Así, de acuerdo con la patogenia en el scrapie se produce primero una acumulación de PrP^{Sc} en el SLR como linfonódulos, tonsilas, tercer párpado, mucosa rectal y bazo, donde el prión se acumula en los centros germinales de los folículos, asociado con macrófagos y CDF. Sin embargo, como la distribución temprana del prión no es homogénea en este tejido, cuando se utiliza el análisis inmunohistoquímico, es necesario examinar un número mínimo de folículos con centros germinales (4 a 6), para establecer un diagnóstico negativo confiable (O'Rourke *et al.*, 2002; Kübler *et al.*, 2003; Gavier-Widen *et al.*, 2005; Monleón *et al.*, 2005; Espenes *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Monléon *et al.*, 2011).

La consistencia de esta característica, permite que en el caso de la EDC, sea el tejido linfoide el elegido para realizar el diagnóstico. En el scrapie, la PrP^{Sc} es detectada en el sistema linforeticular (SLR) mucho antes que en el cerebro, excepto en genotipos que no presentan acumulación periférica del prión. Así es posible el diagnóstico en la etapa preclínica, pudiendo detectarse el scrapie entre los 10 a 14 meses de edad, con la posterior aparición de los signos clínicos entre los 35 a 45 meses. Este acontecimiento, se transforma en el sustento actual de la experimentación y el diagnóstico en animales vivos (Monleon *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2006; MCGOVEN y Jeffrey, 2007; Everest *et al.*, 2011; O'Rourke *et al.*, 2011).

La detección de los priones a través de técnicas inmunológicas, ha demostrado tener un potencial real de diagnóstico en la etapa asintomática de la enfermedad, ya sea *ante-mortem* o *post-mortem* (Farías *et al.*, 2005; Dustan *et al.*, 2008). Las muestras utilizadas corresponden a biopsias de tejidos linfoides ovinos, como tonsilas, tercer párpado, mucosa rectal e incluso bazo (O'Rourke *et al.*, 2000; Hamir *et al.*, 2001; Espenes *et al.*, 2006; Doherr, 2007; González *et al.*, 2008; Everest *et al.*, 2011). El tejido linfoide de elección, debido a su accesibilidad y su asociación estrecha con el tracto gastrointestinal, son las

tonsilas y los linfonódulos retrofaríngeos mediales. El tejido tonsilar tiene mejores resultados en la tinción, sin embargo, para la obtención de la muestra *in vivo* presenta mayor dificultad, por el riesgo al usar anestesia general, lo que se traduce en altos costos técnicos y económicos. Pero al igual que los linfonódulos retrofaríngeos, pueden ser utilizadas *post mortem* en programas de vigilancia epidemiológica, por la confiabilidad del diagnóstico (Detwiler y Baylis, 2003; Monléon *et al.*, 2005; Espenes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Monléon *et al.*, 2011; O'Rourke *et al.*, 2011).

Las muestras de tejido linfoide de tercer párpado o de mucosa rectal, son más factibles de obtener en terreno, a lo más requieren el uso de anestesia local y también pueden ser utilizadas *post mortem*. Sin embargo, la obtención de la muestra es fundamental, puesto que se pueden generar falsos negativos si son muestreados folículos inadecuados o no se incluye el número requerido, lo cual podría deberse a la edad del animal, a la raza o a la obtención de la muestra. En la práctica, es probable que la cantidad de muestras aptas sea dependiente de la experiencia del colector (O'Rourke *et al.*, 2000; Detwiler y Baylis, 2003; Casalone *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; Monléon *et al.*, 2011). En USA, el uso de biopsias del tercer párpado se incorporo al programa de erradicación, como una herramienta de monitoreo activo, por que entrega un diagnóstico con un 80% de certeza. La IHQ desarrollada en estos tejidos, ha demostrado ser confiable en el muestreo de animales expuestos al scrapie que no manifiestan signos, en ovejas afectadas subclínicamente y en los que la enfermedad clínica no ha sido confirmada (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Monléon *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; O'Rourke *et al.*, 2011).

Los folículos linfoides que están presentes a lo largo del intestino en las ovejas, como en el final distal de la mucosa rectal (unión recto anal), se encuentran dispersos en la lámina propia y la submucosa, bajo el estrato de epitelio, lo cual los hace accesible de examinar por medio de una biopsia (Sedgmen *et al.*, 2002; Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; Everest *et al.*, 2011).

Pese a todas las ventajas que presenta el diagnóstico en tejido linfoide, la IHQ y el reconocimiento de lesiones histopatológicas que se realiza en el tejido nervioso, se consideran como los métodos convencionales para realizar el diagnóstico y la confirmación del scrapie o de las EETs según la organización Internacional de Epizootias (OIE), mientras que el ELISA y *WB* son pruebas rápidas, consideradas para el análisis de la masa animal en programas de vigilancia epidemiológica (Monléon *et al.*, 2004; Farías *et al.*, 2005; Dustan *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009; Tattum *et al.*, 2010; Monléon *et al.*, 2011).

Además, existen otras técnicas que son capaces de detectar las lesiones características de las EETs o las formas asociadas a la PrP^{Sc}, como son:

Bioensayos o prueba de infección experimental: es el más sensible y específico para el diagnóstico de EETs, en la cual se reproduce la infección en animales de laboratorio. El roedor es inyectado (vía intracraneal), con un homogenizado preparado de tejido infectado, se espera la aparición de signos clínicos y después de la muerte del animal, el desarrollo de la enfermedad es confirmado usando técnicas clásicas (histología, IHQ, ELISA, *WB*). La disponibilidad de ratones transgénicos que sobre expresan el mismo PrP que la especie donadora, ha aumentado la eficiencia de la transmisión experimental, acortado los periodos de incubación (Monléon *et al.*, 2005; Parveen *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2008; Bishop *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010). El uso de líneas neuronales clonadas altamente susceptibles, permiten reducir el tiempo requerido y pueden ser automatizados (Aguzzi *et al.*, 2004; Kratzel *et al.*, 2007; Baron *et al.*, 2010; Tixador *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011).

Microscopía electrónica: es otra forma de detección, que se puede realizar una vez que los priones se depositan en el SNC, usando tinción negativa en extractos purificados, se observan las SAF (fibras asociadas a scrapie). La detección de las SAF, indica que un animal presenta la PrP^{Sc} atribuida a scrapie, pero su ausencia no significa que esté libre. Se utiliza poco, por su complejidad y requerimientos, relegándose al examen de material en avanzada autólisis (González, 2002; Gavier-Widén *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2008).

Otro grupo de métodos diagnósticos son las pruebas “rápidas”, generados como respuesta a la crisis de 1996, con la epidemia de la EEB y su posible diseminación al hombre, ya que las pruebas existentes no eran adecuadas para hacer un *screening* de la población animal. Estas pruebas de diagnóstico, más simples y rápidas, son útiles para realizar estudios epidemiológicos a gran escala y evaluar una epizootia, o como pruebas rutinarias para garantizar la seguridad de carnes destinadas al consumo. Se basan en la detección inmunológica de la PrP^{Sc}, el único marcador identificable responsable de las EETs, son de alta sensibilidad y especificidad, usualmente finalizadas en pocas horas y aplicadas para pruebas masivas. Muchas han sido evaluadas y algunas están oficialmente aprobadas. La mayoría se basa en pruebas de ELISA o WB (Bozzeta *et al.*, 2004; Farías *et al.*, 2005; Gavier-Widén *et al.*, 2005; Vascellari *et al.*, 2005; Andrievskaia *et al.*, 2008; Grassi *et al.*, 2008; Tattum *et al.*, 2010).

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA): existen diversos tipos para el diagnóstico de EETs, usando cerebro (óbex) o tejido linfático. Las muestras son homogeneizadas y incubadas con proteinasa K, que se analizan usando un ELISA. La PrP^{Sc} puede ser capturada en una microplaca, usando un anticuerpo anti-PrP o alternativamente, con un ligando y un segundo anticuerpo anti-PrP, con un sistema de detección, tiene alta sensibilidad y especificidad (Gavier-Widén *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2006; Everest *et al.*, 2011).

Western blot (WB): fue la primera técnica propuesta por la OIE, para detectar PrP^{Sc} en extractos de tejidos. Las muestras son pretratadas con proteinasa K. La especificidad del WB ha permitido una detección altamente sensible de la PrP^{Sc}. Se utiliza para identificar la cepa del prión, a través de los patrones moleculares (tamaño e intensidad de banda) de las tres glicofomas y de la reacción con anticuerpos directos contra el amino terminal de la PrP, que identifican la estructura molecular del tipo de prión (Parveen *et al.*, 2005; Andrievskaia *et al.*, 2008; Grassi *et al.*, 2008; Dudas *et al.*, 2010; Loiacono *et al.*, 2010; Tixador *et al.*, 2010; Velayos *et al.*, 2010; Vulin *et al.*, 2011).

Sin embargo, para la OIE, la IHQ es la técnica considerada como confirmatoria en el diagnóstico de las EETs, mientras que ELISA y WB son pruebas rápidas, que se utilizan para el análisis de la masa animal en programas de vigilancia epidemiológica (OIE, 2004; Monléon *et al.*, 2005; Pirisinu *et al.*, 2011).

Prevención, control y erradicación

Si se pretende eliminar el scrapie de un país, es esencial identificar y suprimir los factores de riesgo asociados a su propagación. Estudios epidemiológicos y modelos matemáticos son utilizados para complementar las investigaciones sobre la transmisión y la patogénesis de la enfermedad. Éstos han demostrado que el movimiento de animales, el tamaño del rebaño, el número de ovinos genéticamente susceptibles, las prácticas de cruzamiento y el manejo de los partos, son los factores que más influyen en la introducción de la enfermedad y su diseminación a los rebaños (Doherr, 2007; Vaccari *et al.*, 2009; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011).

Entre los factores de riesgo más importantes para la introducción, transmisión y mantención del scrapie en los rebaños se destacan: la incorporación de ovejas infectadas en la etapa preclínica, a través de la compra de animales para la reproducción, el compartir praderas o carneros, contribuyen a la introducción en zonas libres. La principal forma de transmisión y mantención, es la cantidad y la duración de excreción del prión durante el parto, lo cual genera la contaminación del medio ambiente y posterior infección (transmisión horizontal), de gran duración en los ciclos epidémicos por el largo período de incubación y la prolongada supervivencia del agente. Esto depende directamente del periodo de incubación, la vida útil del animal y el posible estado de preñez, así como del tiempo de exposición al agente, la capacidad de sobrevivencia de éste y del número de ovejas genéticamente susceptibles, que pueden resultar del reemplazo, ya sea por compras o cruces (Detwiler y Baylis, 2003; Doherr, 2007; Jeffrey y González, 2007; Jacobson *et al.*, 2010).

El método ideal para prevenir la introducción del scrapie a una zona o país libre, es mantener los rebaños protegidos y aislados, especialmente a las

hembras preñadas. Cualquier oveja de reemplazo o macho para reproducción, debe provenir de rebaños libres y que poseen prácticas de manejo destinadas a prevenir su introducción. Esto es difícil de garantizar, previo a la compra, debido a la inexistencia de una prueba diagnóstica *in vivo*, que asegure la ausencia de la enfermedad. Pero sí es posible identificar al animal, por programas de estudio selectivo realizados mediante biopsias de tercer párpado, de mucosa rectal o de tonsilas, que permiten establecer el estado sanitario de un rebaño y aumentar su valorización comercial (Detwiler y Baylis, 2003; Espenes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Monlón *et al.*, 2011).

La emergencia de la variante de CJD (vCJD) humana, que se relacionó con el consumo de carne contaminada con EEB, además de la transmisión experimental de ésta a ovejas y cabras, han llevado a países endémicos de scrapie, a realizar programas para su control y erradicación (Seuberlich *et al.*, 2007; Dustan *et al.*, 2008; Loiacono *et al.*, 2009; Mitchell *et al.*, 2010). Así, Australia y Nueva Zelanda, detectaron rápidamente la enfermedad tras su introducción y reaccionaron antes de que pudiera ocurrir una transmisión generalizada, fueron capaces de erradicarla en poco tiempo. Mientras que, en Estados Unidos, Canadá e Islandia, en que no se tomaron medidas suficientes, el scrapie se ha convertido en endémico, aún cuando se han implementado estrategias para eliminarlo. Entre las medidas utilizadas se encuentran: la eliminación completa de los animales enfermos, de los en riesgo o sólo de los afectados. Además del manejo durante las pariciones, como la limpieza y desinfección de dependencias y predios, con un periodo durante el cual las especies susceptibles no pueden ingresar, ni usar las instalaciones. El reemplazo de razas originarias o susceptibles por los genotipos resistentes, a través de programas de cruzamiento (Detwiler y Baylis, 2003; Bozzeta, 2004; DEFRA, 2004; Vascellari *et al.*, 2005; Jeffrey y González *et al.*, 2007).

La selección de razas genéticamente resistentes al scrapie, fue adoptada por países que establecieron programas de cruzamientos selectivos. Sin embargo, esta aproximación al control necesita una urgente reevaluación, puesto que hallazgos en Europa sugieren que los ovinos elegidos por estos programas,

podrían ser susceptibles a la aparición de nuevas cepas. Así, la presentación de formas atípicas de scrapie, como la Nor98, han sido descritas en ovejas “resistentes” en Alemania, Portugal y Francia. Estas cepas afectan primero a razas que sólo en raras ocasiones son afectadas por el scrapie tradicional y por el contrario, las típicamente susceptibles no parecen afectarse (Baylis y McIntyre, 2004; Seuberlich *et al.*, 2007; Benestad *et al.*, 2008; Loiacono *et al.*, 2009; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011; Mitchell *et al.*, 2011; Vulin *et al.*, 2011).

En países como Chile, en que el scrapie no se ha descrito, son muy importantes las medidas de prevención que se puedan adoptar. Para impedir su introducción, se deben mantener los predios bien protegidos, especialmente a las hembras preñadas, cualquier reemplazo de hembras o cruzamientos con machos, éstos deben venir de rebaños libres o con manejos preventivos. Conocer las precauciones que se deben tomar al comprar animales, como: el nivel sanitario de los predios de donde provienen, si es desconocido, realizar cuarentenas; contemplar estudios de genotipos para seleccionar a los resistentes. Si en el rebaño está presente la enfermedad, minimizar el riesgo de una diseminación o reintroducción, con medidas como: separar los animales en riesgo, realizar limpiezas y desinfección, mejorar el manejo de los partos, remover las membranas fetales, la placenta y cambiar la cama entre cada parto, segregar el rebaño en grupos pequeños. En algunos países el control consiste en la eliminación completa del rebaño afectado, así como de aquel desde donde provenían. Aunque no se ha comprobado la participación de las harinas de carne y hueso (HCH) contaminadas en la transmisión del scrapie, se recomienda prohibir la alimentación de ovinos y caprinos con HCH de rumiantes, donde la enfermedad es endémica o se ha detectado otra EET (Detwiler y Baylis, 2003; OIE, 2007; Benestad *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2011).

La ausencia de técnicas diagnósticas validadas en animales vivos, junto con el largo período de incubación y la variabilidad de expresión de los signos clínicos, hacen difícil el establecer medidas tendientes a su control. Aún así, el desarrollo de herramientas diagnósticas cada vez más confiables y sensibles,

contribuyen a los programas de control y prevención (Baylis y McIntyre, 2004; CRL, 2007; Ducrot *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009; Terry *et al.*, 2011).

El prión del scrapie es altamente resistente a los desinfectantes, el calor, la radiación ultravioleta o ionizante y la formalina, pero la desinfección efectiva es posible con autoclave sobre los 133°C por 20 min. Los tejidos contaminados deberían ser incinerados y la desinfección de equipos con hipoclorito de sodio (2 %) e hidróxido de sodio (2 N), que son efectivos cuando se aplican a 20°C por más de 1 hora (Taylor y Woodgate, 2003; OIE, 2007; Seidel *et al.*, 2007).

Salud pública

Las EETs constituyen un grupo de enfermedades desafiante científicamente, de baja prevalencia. Sin embargo, debido a la alta transmisibilidad de la EEB a otras especies y a los humanos (Fournier y Grigoriev, 2001; Dormont, 2002; Dustan *et al.*, 2008; Everest *et al.*, 2011) y que es una enfermedad que afecta al SNC, a pesar de su baja incidencia es un problema de salud pública. En el esfuerzo para controlar la EEB, junto con las EETs de pequeños rumiantes, los recursos fueron destinados a programas de control y cambios en las industrias de alimentos (Doherr, 2007; Seuberlich *et al.*, 2007; Vulin *et al.*, 2011).

Aún cuando el scrapie se ha presentado en ovinos y caprinos europeos por siglos y se ha reportado en cada continente donde se crían ovinos, su relevancia sólo se vio incrementada por la epidemia de EEB, ocurrida en el Reino Unido. Ésta se relacionó con el consumo de alimento concentrado para vacunos, elaborado con HCH provenientes de ovejas y cabras con scrapie. Además del reconocimiento de la vECJ en el humano y su relación con la EEB por el consumo de alimentos cárnicos contaminados con priones. Lo que, se reafirmó ya que los casos de vECJ se inician y restringen al Reino Unido, lugar donde ocurría la epidemia de EEB (Delgado-Hachmeister *et al.*, 2002; Bozzeta, 2004; Aguzzi, 2006; Vargas *et al.*, 2006; FAO, 2009; Vaccari *et al.*, 2009).

El scrapie, históricamente ha sido considerado no patógeno para el humano, en contraste con la EEB, la que se ha transmitido a felinos, alces, ciervos y

humanos, entre otros, por consumo de productos contaminados. Si bien, no existe evidencia epidemiológica que indique que el scrapie signifique riesgo para la salud humana, por consumo de productos cárnicos ovinos, ni que sea transmitida a través del contacto con estos animales. La posibilidad que el prión de la EEB sea transmitido a los ovinos, como se ha demostrado experimentalmente, junto con la vinculación directa entre la vECJ y la EEB, la convierten en una amenaza potencial para la salud humana (González, 2002; Will, 2002; Andrews *et al.*, 2003; Lezmi *et al.*, 2003; Smith y Bradley, 2003; Monleón *et al.*, 2005; Wadsworth y Collinge, 2007; Ducrot *et al.*, 2008).

Aunque el riesgo biológico de realizar procedimientos diagnósticos de scrapie parece ser limitado, es necesario tomar precauciones. La existencia de scrapie natural en ovinos domésticos durante más de dos siglos y la incapacidad de demostrar alguna relación entre éste y las EETs humanas, indican un bajo riesgo para quienes trabajan con el agente etiológico. Así, se ha descrito que la frecuencia de la vECJ, no es mayor en las personas que tienen contacto con este prión, comparadas con otros grupos. Sin embargo, la extrema resistencia química y física del prión y el hecho de que puede transmitirse a un amplio espectro de especies, sugieren la prudencia de prevenir la exposición humana (Sakudo *et al.*, 2011). Debido a la relación establecida entre la EEB y la vECJ, ésta y los priones, son categorizados en relación al riesgo biológico con las EETs humanas. Aunque el scrapie esté excluido, se recomienda la adopción de medidas similares a las utilizadas para otros priones, cuando se trabaje con scrapie en el laboratorio (OIE, 2004; Seuberlich *et al.*, 2007; FAO, 2009).

La posibilidad de la transmisión del prion de EEB a los ovinos y caprinos, significa un gran riesgo para la población ovina y humana, ya que la patogenia de la EEB en la oveja es diferente a la de la vaca. En bovinos la EEB, está principalmente limitada al SNC, mientras que en ovinos se disemina por el sistema linforeticular, por lo que, la PrP^{Sc} estaría en la carcasa completa. Además, se ha demostrado la transmisión de la EEB desde la oveja a la cría vía placenta. Por lo que, sería un error dejar de investigar, ya que la posibilidad de que la EEB sea transmitida hacia el ovino y caprino y de éstos al humano,

no ha sido descartada (O'Rourke *et al.*, 2002; Watts *et al.*, 2006; Van Keulen *et al.*, 2008b; Vaccari *et al.*, 2009; Tranulis *et al.*, 2011; Vulin *et al.*, 2011).

Situación nacional

Según lo indicado por la OIE (diciembre 2010), Chile es reconocido como país donde nunca se ha descrito el scrapie, aún cuando no se especifica un método de vigilancia, a pesar de ser de declaración obligatoria. Así, se encuentra categorizado como “enfermedad ausente en el país o nunca señalada”, la medida para prevenir su ingreso es la cuarentena en las fronteras y si se llegasen a presentar casos, se deben declarar (OIE, 2010).

El organismo oficial de sanidad animal en el territorio nacional es el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), encargado de mantener la vigilancia de las enfermedades denunciadas, que permita verificar la condición sanitaria, disponer de un mecanismo de detección temprana para las de carácter exótico (que no existe en el país) y monitorear los cambios en las que están presentes. En rumiantes, realiza vigilancia para Fiebre Aftosa, Lengua Azul, Estomatitis Vesicular y scrapie. La que se focaliza en áreas limítrofes de regiones que por sus características geográficas y climáticas, se podría realizar movimiento ilegal de animales con otros países (SAG, 2010).

El sistema de vigilancia pasiva es realizado por la recepción y atención de denuncias de enfermedades que pudiesen afectar a los animales. Es un sistema de recolección de información, importante para el control y la epidemiología en la población animal. Para scrapie, la vigilancia se realiza sólo en ovinos de mataderos de las regiones de Aysén y Magallanes, donde se produce la mayor faena ovina del país (SAG, 2010; Farías *et al.*, 2011).

Con respecto al ganado bovino, en Chile el programa de vigilancia intensiva de EEB comenzó el 2005, basado en las normas de la OIE (OIE, 2004), que define las poblaciones de animales en riesgo que deben ser analizadas; establece el esquema que deben cumplir las regiones, que aspiran a alcanzar una condición de país con riesgo insignificante; el puntaje de vigilancia a alcanzar según la situación zoonosaria de cada país y de la población animal muestreada. Un

componente de este programa, se enmarca bajo el concepto de vigilancia activa y obedece a la toma de muestras en diferentes especies animales, para verificar la ausencia de determinada enfermedad (SAG, 2010).

Desde que la EEB tomó importancia, al final de los 80', se han realizado acciones tendientes a controlar y prevenir esta enfermedad, especialmente en Europa, con la creación de normativas para evitar la transmisión al humano. En Chile desde 1990, se han adoptado las medidas indicadas por los organismos internacionales (OIE y OMS) (FAO, 2003; SAG, 2008), las cuales se actualizan de acuerdo a la realidad epidemiológica de cada año, en el marco del programa de prevención de la EEB, tendientes a evitar su ingreso. La cual podría poner en riesgo la salud humana y animal e incidir en el comercio y consumo de productos y subproductos de origen bovino. Los antecedentes epidemiológicos, permiten afirmar que en Chile no se han descrito casos de EEB, lo que ha contribuido al desarrollo del país como exportador de carnes rojas. Sin embargo, los programas de vigilancia realizados son de tipo pasivo y las medidas adoptadas, incluyen sólo de forma indirecta al scrapie, ya que están orientadas a la EEB (SAG, 2007; Farías *et al.*, 2009).

Entre las medidas tendientes a mantener la condición de país libre, en 1990 se adoptaron, la prohibición de importar animales vivos, productos, subproductos, semen y embriones desde países que no pudieran acreditar dicha condición, además de alimentos destinados a rumiantes, que tuvieran proteínas de origen rumiante; se fijaron exigencias para la internación de glándulas, harinas y extractos de sangre, carne o hueso, sólo desde países oficialmente libres. En el 2000, se realiza una evaluación de riesgo cualitativo de existencia de EEB en el país, a partir del scrapie; se establece la notificación obligatoria y las exigencias para importar alimentos destinados a mascotas (DEFRA, 2008). Se aplica un programa de vigilancia activa y pasiva para los síndromes compatibles con EEB, se tomaron muestras de cerebro de bovinos, ovinos y caprinos, para el diagnóstico histopatológico de las EETs, de acuerdo a lo indicado por la OIE, pero no se detectó su presencia. Ese año, cambió el escenario mundial por el aumento del número de casos, Chile debió ajustar sus medidas preventivas, que se orientaron a manejar el posible ingreso de la enfermedad, a demostrar y

comunicar la situación de país libre de EEB, por la apertura de nuevos mercados, a estabilizar el sistema de vigilancia y a mitigar el desafío externo. Como medida sanitaria de extrema prevención, se prohibió la formulación, elaboración, distribución, venta, uso de alimentos y suplementos que contuvieran proteínas de rumiantes (SAG, 2008).

El aumento de países con casos nativos de EEB entre el 2001 y 2003 (Trevitt y Singh, 2003; Stack *et al.*, 2004; Doherr, 2007), cambió el escenario mundial, la prevención apuntó a los consumidores, que mostraron mayor sensibilidad a las enfermedades animales que representan peligro para la salud humana y a la inocuidad de los alimentos. Se adoptaron medidas adicionales para impedir el ingreso de la enfermedad y minimizar la posibilidad de incorporar el príon a la cadena alimentaria. Así como, demostrar y comunicar la condición de país libre de EEB, que traería buenos resultados económicos, además de cumplir las recomendaciones de la OIE para inactivar el príon de la EEB en fábricas que procesaran HCH como: tamaño máximo de partículas (50 μ m), tratamiento térmico a 133°C, por más de 20 min, a 3 bares de presión y la fiscalización. Se amplió la prohibición de importar productos con tejidos de riesgo y se eliminaron, mediante sacrificio sanitario, 64 bovinos importados desde Dinamarca en 1998, como medida de extrema precaución (SAG, 2007).

El primer caso nativo de EEB en Canadá el 2003 y posteriormente en Estados Unidos (Stack *et al.*, 2004; Dudas *et al.*, 2010); países desde donde Chile importó HCH entre 1998 y 2000, aumentó las medidas de prevención a partir del 2003, orientadas a controlar la vía alimentaria de transmisión, se incrementó la fiscalización y se caracterizaron fábricas y plantas elaboradoras de alimentos e insumos, destinados a la alimentación animal. Se prohibió el alimento con proteína mamífera a rumiantes y se realizó el rastreo e identificación de los planteles que utilizaron las HCH importadas. Se estableció un sistema de vigilancia, para los animales que presentaran signos neurológicos o alteraciones en el comportamiento. Se realizó un muestreo sistemático para el diagnóstico histopatológico de EETs, en cerebros de rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos) en edades de riesgo, considerando

adultos y/o con enfermedades crónicas progresivas en animales faenados en mataderos, provenientes de las zonas con mayor dotación de animales y de casos con sintomatología nerviosa, de acuerdo a los estándares de la OIE. Como todos los resultados fueron negativos, fue posible establecer que en Chile, la enfermedad no fue detectada (SAG, 2007; SAG, 2008).

Actualmente, el país cuenta con un laboratorio oficial central y dos en regiones, que reciben las muestras de cerebros, para realizar el diagnóstico, a través de técnicas reconocidas por normativas internacionales, pero que apuntan al diagnóstico de la EEB por: histopatología, ELISA, WB o inmunohistoquímica (Farías *et al.*, 2005; Machuca *et al.*, 2006; Farías *et al.*, 2009). Esta situación contrasta notoriamente con la realidad del scrapie, puesto que si bien esta enfermedad no ha sido descrita, las medidas que toma el país para su prevención y control son insuficientes.

Las medidas adoptadas para enfrentar la EETs en Chile, apuntan directamente a la EEB y dejan en segundo plano al scrapie. Sin embargo, la importancia de éste, es que sigue siendo potencialmente peligroso, por las posibilidades de que el prión ovino pueda afectar a la población bovina y/o humana, aún cuando no ha representado un riesgo directo (Detwiler y Baylis, 2003; DEFRA, 2004 Everest *et al.*, 2011). Sin embargo, la hipótesis de que el origen de la EEB proceda a partir de una cepa de scrapie, además de la posibilidad que el prión de la EEB sea transmitido a los ovinos y la vinculación entre la vCJD y la EEB, convierten al scrapie en una amenaza potencial para la salud humana (Detwiler y Baylis, 2003; DEFRA, 2004; FAO, 2009). Teniendo en cuenta que, la signología de los casos naturales del scrapie y los de EEB inducidos en ovinos son similares (Nonno *et al.*, 2003; CRL, 2004; Bellworthy *et al.*, 2005; Thuring *et al.*, 2005; O'Rourke *et al.*, 2011; Vulin *et al.*, 2011). Si bien la presencia de scrapie no ha sido confirmada en el país, las escasas medidas tomadas para su prevención y control son: la vigilancia a los animales susceptibles en zonas en las cuales el beneficio de ovinos adultos es mayor al 6% del total nacional. Así, el muestreo apunta a mataderos de las regiones de Aysén y Magallanes; a los animales con signos clínicos compatibles, a ovinos caídos, mortecinos o

sacrificados de emergencia; el tamaño de muestra es de 6 ovinos para Aysén y 143 para Magallanes; se recolecta la cabeza del animal y la técnica diagnóstica es el ELISA (Farías *et al.*, 2009; SAG, 2010).

Las medidas adoptadas en el país con respecto a la EEB, significó que Chile el 2006, fuera reconocido y ratificado oficialmente por la OIE como país provisionalmente libre, según el Código Sanitario para animales terrestres. Esta categoría fue obtenida luego que la OIE, el 2005, realizara una evaluación a los antecedentes del país. La cual, permitió afirmar que la EEB no estaba presente y lo de provisional indicaba que a esa fecha, no se cumplían los 8 años de prohibición de alimentar a rumiantes con HCH de rumiantes (OIE, 2007; SAG, 2007). Actualmente Chile ha sido reconocido como país con riesgo insignificante de EEB (OIE, 2010; SAG, 2010).

Así el rubro ganadero ovino del país, tiene un gran potencial para desarrollarse, desde la zona centro hasta el sur (Magallanes), esto por las condiciones de praderas y la disponibilidad de infraestructura, sumado al nivel actual de precios en el ámbito nacional e internacional, lo que ha aumentado el interés en su crecimiento.

Situación mundial de las EETs

El impacto de las EETs y particularmente de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) para la salud humana, parece estar más limitado de lo que inicialmente se creía (WHO, 2012). Ésto debido a la disminución gradual en el tiempo de nuevos casos de EEB, los cuales se limitan principalmente a Europa y Norteamérica. Así, en la Unión Europea (UE) los casos han disminuido notoriamente desde 2.167 en el año 2001, a sólo 7 nuevos casos en el 2011 (OIE, 2012a). Sin embargo, con el scrapie la situación es bastante diferente, puesto que por ejemplo, en el Reino Unido se confirmaron 28 nuevos casos en el 2010, número que se elevó a 161 al año siguiente (OIE, 2012b; VLA, 2012a).

Ante el actual escenario de estas enfermedades, la Unión Europea planteó nuevas estrategias contra las EETs para el período comprendido entre los años 2010 a 2015. Como se sabe, ya desde julio de 1994 se introdujo la prohibición

de alimentar al ganado bovino, ovino y caprino con harina de carne y huesos procedentes de mamíferos. Posteriormente con la confirmación de la vCJD, a partir del año 2001 se amplía dicha medida en la UE, a la suspensión total del uso de proteínas animales transformadas en piensos para animales destinados a la producción de alimentos (OIE, 2012a,b; WHO, 2012). Sin embargo, dentro de las nuevas medidas adoptadas en el 2010, está la tolerancia de dichas proteínas en piensos destinados a los animales no rumiantes de granja, ya que con ello, disminuiría en la región la dependencia de otras fuentes de proteínas. Esto será aceptado sólo si se dispone de técnicas analíticas validadas para determinar a qué especie pertenecen estas proteínas (C.E, 2010.)

Por otra parte, los programas de vigilancia han consistido en la evaluación, mediante alguna prueba diagnóstica rápida, de todos los bovinos de más de 30 meses (animales sanos), sacrificados para el consumo destinado a humanos y además, a todos los bovinos de más de 24 meses que han muerto, ya sea por muerte súbita o por sacrificio de urgencia (animales de riesgo). Sin embargo, en este nuevo período y basándose en criterios epidemiológicos, un estado miembro de la UE que pueda demostrar la mejora de la situación de la EEB en su territorio, puede solicitar la autorización para revisar su programa de vigilancia. Es así como, desde el año 2009 se ha autorizado a 17 países miembros para incrementar a 48 meses, el límite de la edad de los bovinos para la realización de las pruebas diagnósticas mencionadas (C.E, 2010).

Respecto al scrapie en la UE, las actuales disposiciones para su erradicación de los rebaños ovinos y caprinos son variadas: desde el sacrificio total o selectivo de los animales genéticamente sensibles en los rebaños infectados; los programas de cría para seleccionar por resistencia a las EETs, en rebaños de alto valor genético; la repoblación con animales genéticamente resistentes y el refuerzo de la vigilancia en rebaños infectados. Sin embargo, de acuerdo con la gran complejidad del scrapie (particularmente por la presentación de sus cepas atípicas), la incertidumbre actual sobre su potencial valor zoonótico y la gran diversidad de factores que influyen en la transmisión de la enfermedad, las nuevas medidas y decisiones políticas que podrían aplicarse en la UE para

el período 2010-2015 aun están siendo reflexionadas, esto principalmente en base a los resultados de las investigaciones que se llevan a cabo y al asesoramiento científico sobre las EETs de pequeños rumiantes. Por lo cual, la UE estaría considerando las siguientes medidas: establecer condiciones para la certificación de rebaños de pequeños rumiantes en cuanto a las EETs, a partir de los resultados de pruebas diagnósticas rápidas, además de las directrices de la OIE que apuntan a evitar la propagación del scrapie a través de los animales asintomáticos que están infectados; a continuar con la adaptación de las medidas contra el scrapie atípico, si los datos científicos confirman que la cepa implicada no es contagiosa; a aprovechar la resistencia genética de algunos genotipos en la población caprina, si es que la investigación científica lo confirma; y a fomentar el control genético del scrapie ovino a través de programas de cría (C.E, 2010; OIE, 2012b).

Respecto de otras EETs en los animales, la encefalopatía espongiiforme felina (EEF) que fue identificada por primera vez en el Reino Unido en el año 1990, y que posteriormente se describió en otros países como Noruega, Irlanda del Norte, Liechtenstein y Francia (Lezmi *et al.*, 2003). La mayoría de los casos han sido descritos en animales domésticos, pero también en felinos exóticos en cautiverio, como por ejemplo en: guepardo, león, leopardo, ocelote, puma y tigre (Imran y Mahmood, 2011). Uno de los casos más recientes que ha sido informado, afectó a una hembra guepardo de 9 años de edad que se encontraba en cautiverio en el zoológico de Nuremberg, Alemania. La inmunohistoquímica reveló un patrón similar a la EEB, con una amplia distribución de la PrPsc en el sistema nervioso central y periférico, así como también en el sistema linfático (Eiden *et al.*, 2010). Desde su aparición, en el Reino Unido se han confirmado 89 casos de EEF. Sin embargo, en los últimos 10 años ha existido una disminución brusca de casos nuevos con EEF, como resultado de las modificaciones realizadas a las normativas que rigen la producción de alimentos destinados a estos animales (VLA, 2012b).

La enfermedad del desgaste crónico (EDC) es otra importante EET que afecta a los cérvidos, principalmente de vida silvestre. Desde el primer caso descrito

en un venado (*Odocoileus hemionus*) en cautiverio en la década de los 60' en Colorado USA, pasando por el diagnóstico de la enfermedad en un venado y en un alce (*Cervus elaphus nelsoni*) de las montañas Rocallosas en 1978, la EDC se ha transformado en una enfermedad endémica en Norteamérica (Sigurdson y Müller, 2003; Buchannan, 2012). Con el incremento del muestreo de animales en los últimos 10 años, se ha podido conocer más sobre la diseminación del EDC en este continente, la cual además de estar presente en varios estados del oeste de Estados Unidos y en Canadá, continúa siendo indentificada en nuevas regiones geográficas (Sigurdson, 2008; Saunders *et al.*, 2012). Así, la EDC ha sido indentificada en cérvidos de vida libre y de cautiverio en 15 estados de USA y en 2 provincias de Canadá, además se ha descrito en Corea del Sur. Con excepción de éste último país, la EDC no ha sido detectada fuera de Norteamérica. Tomando en cuenta la situación actual de diseminación de la EDC en Norteamérica y la falta de un tratamiento efectivo, la erradicación completa actualmente no es factible. Mucho queda por conocer sobre las EETs y la EDC, especialmente en relación a las cepas y sus efectos a largo plazo en el ecosistema de los cérvidos (Saunders *et al.*, 2012).

Respecto a las EETs en los humanos, según datos de la OMS (2012), desde el primer caso descrito de vECJ en octubre del año 1996 a Marzo del 2011, se han descrito un total de 219 casos, de los cuales 175 corresponden al Reino Unido, 25 a España, 4 de Irlanda, 3 a Holanda y también a USA, 2 a Canadá, Italia y Portugal, y un caso en Japón, Arabia Saudita y Taiwán. Sin embargo, debido a las medidas restrictivas adoptadas en Europa, de acuerdo con la relación encontrada entre la EEB y la vECJ, la tendencia a la aparición de nuevos casos es menor, ya que por ejemplo el Reino Unido que tuvo su mayor impacto en el año 2000 con 28 casos, posteriormente hasta el año 2008 ha presentando sólo 2 casos diagnosticados de vECJ (WHO, 2012).

El alto linfotropismo de algunas estirpes de priones, como las de scrapie, vECJ y EDC, ha sugerido el uso de la inmunohistoquímica para detectar la PrP^{Sc} en tejido linfoide antes de que se inicien las manifestaciones clínicas, permitiendo así realizar el diagnóstico preclínico de estas EETs (Thuting *et al.*, 2005;

Espenes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Grassi *et al.*, 2008; Monleón *et al.*, 2011). La importancia de este estudio, apunta a ensayar un sistema de detección para el príon de los ovinos, utilizando un tejido que se ha comprobado que tiene participación en el ciclo de replicación, pero que no es utilizado en el país como prueba diagnóstica. En Chile la utilización de muestras de cerebro de ovinos, continua siendo la base para el diagnóstico de scrapie, por lo cual la estandarización y utilización de tejido linfoide como muestra apta para IHQ, permitiría implementar esta técnica como método preclínico de diagnóstico, que podría ser utilizada para la detección de esta enfermedad *in vivo*, logrando así establecer medidas de control para animales que estén incubando el scrapie, aún cuando no manifiesten signos clínicos.

En base a estos antecedentes y las posibilidades futuras en el campo del diagnóstico, prevención y control de las EETs, se planteo implementar en el país esta técnica de detección mediante métodos no invasivos, que permitan realizar el estudio de la masa ovina sin la necesidad de esperar la muerte de los animales, estén o no afectados. Es importante destacar, la necesidad de contar con herramientas de diagnóstico preclínico para estas enfermedades, más aún cuando la especie ovina se comercializa muchas veces antes de que se manifieste la sintomatología, por el largo periodo de incubación que puede presentar el scrapie.

El objetivo central de este trabajo fue el de contribuir al diagnóstico preclínico del scrapie a través del estudio inmunohistoquímico del tejido linfoide de tercer párpado y de la mucosa rectal de ovinos. Para ello nos propusimos por una parte, determinar la calidad o aptitud de la muestra obtenida del tejido linfoide, mediante la utilización de la técnica de Hematoxilina y Eosina y por otra, implementar la detección inmunohistoquímica de la PrP^{Sc}, en tejido linfoide de tercer párpado y de mucosa rectal para evaluar scrapie.

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de las muestras

La recepción, procesado y análisis de los tejidos utilizados se realizó en la unidad de Patología del Departamento Laboratorio y Estaciones Cuarentenarias Agrícola y Pecuaria “Lo Aguirre” del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile (SAG). Este laboratorio cuenta con normas de bioseguridad tipo 2, necesarias para manipular y procesar este tipo de muestras.

Se procesaron muestras de tejido linfóide, 100 correspondientes al tercer párpado y otras 112 a la mucosa de la porción terminal del recto, procedentes de ovinos entre los 2 a 4 años de edad, obtenidas post mortem, sin importar raza o sexo.

Del total de las muestras de tercer párpado, 44 fueron obtenidas directamente en matadero, mientras que otras 42 fueron recogidas en la unidad de patología del SAG, a partir de cabezas y párpados provenientes de animales con sintomatología compatible a scrapie de distintas regiones de Chile. Además, se utilizaron 14 muestras ciegas de validación de tercer párpado y sus respectivos óbex, aportadas por un centro de referencia canadiense.

El segundo grupo de muestras que se sometieron a este estudio, corresponden al tejido linfóide ubicado en la porción terminal del recto, las cuales fueron obtenidas de 100 ovinos, procedentes de mataderos ubicados en Punta Arenas (XII Región de Magallanes y la Antártica chilena). Además, de 12 muestras ciegas de validación de mucosa rectal y sus respectivos óbex, aportadas por un centro de referencia canadiense.

Para la inmunohistoquímica (IHQ), se utilizaron como controles 37 muestras de óbex de ovinos, que correspondían a 19 positivas y 18 negativas, todas ellas fueron aportadas por el centro de referencia canadiense (National Reference Laboratory for Scrapie and CWD, Animal Research Institute y Canadian Food Inspection Agency).

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a O'Rourke *et al.* (2002), adaptado al protocolo utilizado en el laboratorio de patología del SAG, además de las recomendaciones del *kit* comercial Pullman TSE-IHC/99 (VMRD, 2002).

3.1.1. Muestreo de tejido linfoide del tercer párpado de ovino

Para la recogida de muestras de tercer párpado se adaptó la técnica descrita por O'Rourke *et al.* (2000). Brevemente: se extrajo completamente el tercer párpado (Fig. 3.1), tanto en el matadero como en el laboratorio, para luego realizar el procedimiento de disección y obtención sólo del tejido linfoide, el cual se posicionó en un *cassette* histológico, que fue identificado y fijado en una solución de formalina neutra (10%), donde fueron mantenidos durante una semana.



Figura 3.1. Toma de muestras de tercer párpado y aspecto macroscópico de la muestra obtenida.

3.1.2. Muestreo de tejido linfoide de mucosa rectal de ovino

Para estandarizar la técnica de recogida de muestras de tejido linfoide de mucosa rectal, se obtuvieron cortes de la mucosa a 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 cms de la línea recto-anal. Las muestras fueron procesadas para evaluar a qué nivel son más aptas para la obtención de tejido linfoide.

Las muestras de recto se tomaron mediante disección, para lo cual se realizó primero un corte a 4 cms craneales del ano. Los segmentos obtenidos se fijaron y mantuvieron en formalina neutra 10% y se enviaron en frascos

cerrados previamente rotulados. Una vez recepcionadas las muestras se laminaron a las diferentes distancias (Fig. 3.2) desde la línea recto-anal (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 cms), con el propósito de definir la zona óptima para realizar una biopsia *in vivo*. Los cortes se colocaron en *cassettes* histológicos, se identificaron con un número en la parte frontal y otro en la cara lateral, según número de muestra y de acuerdo a la distancia de corte respectivamente. Luego se mantuvieron en formalina neutra (10%) durante una semana.



Figura 3.2. Fotografía del recto ovino. Los Alfileres indican las distintas distancias desde la línea recto-anal que se seleccionaron para este estudio.

3.2. Procesado de las muestras

Pasado el tiempo de fijación, todas las muestras se retiraron de la formalina y fueron sometidas a deshidratación y aclaramiento, en un procesador de tejidos automático (Leica TP1020). Se eligió un programa (Anexo 1), que secuencialmente mantiene los tejidos en alcohol en graduación creciente, luego en xilol y finalmente en parafina. La duración total del proceso fue de 16 h.

Posteriormente utilizando un centro de inclusión (Leica EG1160), las muestras fueron incluidas en bloques de parafina, dejando hacia la superficie de corte del micrótopo el extremo correspondiente al tejido linfoide del tercer párpado y/o a la distancia seleccionada desde la línea recto-anal. Se realizaron cortes histológicos de 5 μm de espesor, en un micrótopo (Leica RM2145). De cada

bloque se obtuvieron cortes seriados, los cuales fueron montados en dos portaobjetos: uno de ellos, fue teñido con el método de Hematoxilina/Eosina (H-E), para el análisis histopatológico y la evaluación de la aptitud de la muestra, mientras que el segundo fue utilizado para la detección de antígeno priónico mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

3.3. Evaluación de la aptitud de las muestras

Previamente a la realización de la técnica de IHQ, se procedió a evaluar la aptitud de las muestras, mediante la tinción H-E, para confirmar la observación en cantidad de folículos linfoides con los centros germinales necesarios para el diagnóstico. El primero de los cortes de cada muestra, fue montado en un portaobjeto (Citoglas) previamente desengrasado, cubierto con una capa de albúmina como medio adherente y secado en una estufa (Thelco 31608) a 37°C durante 30 min. Los portaobjetos se distribuyeron en un canastillo donde se mantuvieron a 60°C por 30 min y en seguida en una estufa (Elconap B-1-P) a 37°C durante toda la noche.

Posteriormente, los tejidos fueron sometidos a baños de xilol, de alcoholes en graduación decreciente, para su posterior hidratación (Anexo 2) y a continuación teñido con la técnica de Hematoxilina y Eosina (H-E) (Anexo 3), siguiendo el protocolo de rutina (Fink, 1987). Una vez terminados estos pasos, se procedió al montaje de la preparación, para lo cual se extrajo el portaobjeto del último xilol y se colocó el cubreobjeto. Así se procesaron el total de las muestras, que finalmente fueron observadas en un microscopio (Nikon HFX-DX) para describir las estructuras presentes.

La clasificación de aptitud, dependió del número de folículos linfoides observados. Así, para designar una muestra como apta se debían observar al menos 4 folículos linfoides en cada corte histológico analizado, puesto que para determinar una muestra como negativa por la técnica de IHQ, es necesario que al menos existan 4 folículos linfoides y que en ninguno de estos se presente la reacción de inmunotinción. Siguiendo este criterio, las muestras no aptas

fueron aquellas que presentaban menos de 4 folículos linfoides (O'Rourke *et al.*, 2000; Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008).

3.4. Detección de la proteína priónica en tejido linfoide de ovinos

Una vez clasificadas las muestras mediante la tinción de H-E, aquellas que se consideraron como aptas se sometieron a la técnica de IHQ, para la detección de antígeno priónico. Para el estudio inmunohistoquímico, se utilizó el corte seriado de cada muestra clasificada como apta en el estudio histológico. Los cortes destinados al estudio inmunohistoquímico fueron montados en portaobjetos ProbeOn Plus (FisherBiotech®), que poseen carga eléctrica lo que mejora la adherencia. Además, estos cortes se posicionaron verticalmente sobre papel absorbente con el propósito de eliminar el exceso de agua bajo el tejido, excluyendo del procesamiento la utilización del secador de portaobjetos. Posteriormente se sometieron a calor en una estufa (Thelco 31608) a 60°C por 1 h y luego se mantuvieron en una estufa (Labtech LDO – 100E) a 37°C durante toda la noche.

A continuación, estos tejidos fueron sometidos a baños de xilol y alcohol en graduación decreciente para su posterior hidratación (Anexo 4). Inmediatamente se realizó el protocolo de inmunohistoquímica que resumidamente se describe a continuación, en el que se utilizaron controles positivos y negativos de óbex provenientes de un laboratorio de referencia canadiense (Nacional Referente Laboratory for Scrapie and CWD, Animal Research Institute, Canadian Food Inspection Agency).

Bloqueo de peroxidasa endógena: debido a que esta técnica utiliza un método de marcaje con peroxidasa, fue necesario inhibir la actividad endógena de esta enzima en el tejido en estudio. Para esto, las muestras se mantuvieron por 10 min en una solución de agua oxigenada al 3% en metanol absoluto. Luego fueron sumergidos en agua bidestilada para retirar los restos de la solución utilizada.

Activación antigénica de tejido: las muestras se incubaron en ácido fórmico (98%) a 25°C durante 5 min, con el propósito de descontaminar los tejidos y aumentar la sensibilidad a la inmunotinción. Se lavaron en una solución tampón TBST pH 7,6 (Tris Buffer Salino-Tween 20) durante 2 min por 3 veces. Luego fueron transferidas a una solución recuperadora de antígenos pH 7,6 (Target Retrieval Solution®) e incubadas en un autoclave a 120°C por 20 min y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Una vez frías, las muestras fueron incubadas en una solución de TBST pH 7,6 por 10 min. Los portaobjetos fueron colocados en un sostenedor (Slide Holder, Fisher Biotech®) de manera pareada para que se formara un espacio de capilaridad entre ambos y así se realizó la técnica de Inmunohistoquímica, siguiendo el protocolo del *kit* comercial (Pullman Monoclonal F99/97.6.1) (VMRD, 2002).

3.4.1. Inmunotinción

Proteinasa K: se agregaron 180 µL de una solución de proteinasa K en cada pocillo de un dosificador (Isolon®) para cada par de portaobjetos. Las muestras se incubaron a 25°C por 90 seg, seguidos de 3 lavados con TBST pH 7,6.

Anticuerpo primario monoclonal: se agregaron 180µL de una solución del primer anticuerpo monoclonal (F99/97.6.1) (dilución 1:1000), en el cual las muestras fueron incubadas a 37°C por 15 min y se lavaron 3 veces con TBST pH 7,6 (Spaker *et al.*, 2002).

Anticuerpo secundario policlonal biotinado: se agregaron 180µL de una solución del segundo anticuerpo policlonal anti-ratón biotinado, donde las muestras fueron mantenidas a 25°C durante 10 min y luego se realizaron 3 lavados con TBST pH 7,6.

Streptavidina – HRP: en cada pocillo del dosificador, se agregaron 180µL de streptavidina conjugada con HRP peroxidasa (Horseradish Peroxidase), las muestras fueron incubadas a 25°C durante 10 min, seguido de 3 lavados con TBST pH 7,6.

Revelado de la reacción inmunológica con sustrato de cromógeno AEC: para poner de manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo, las muestras fueron incubadas con 180µL del sustrato de cromógeno AEC (3-amino-9-etilcarbazol) por un total de 20 min (divididas en 2 incubaciones de 10 min) y protegidas de la luz directa. La reacción se detuvo con lavados de agua bidestilada.

Tinción de contraste: la cual se utilizó para visualizar el tejido nervioso, se incubaron las muestras con hematoxilina de Meyer's (Dako®) durante 10 min. Luego fueron retiradas del sostenedor y reubicadas en un cestillo, donde se realizó un lavado suave con agua. Los portaobjetos se dejaron en agua hasta el momento de realizar el montaje de los cubreobjetos, con un medio acuoso permanente (Faramount, Dako®) (Boenisch, 2001; Machuca *et al.*, 2006).

3.5. Análisis de las muestras

Estudio histológico: una vez realizada la tinción de H-E, después de observar y cuantificar los folículos linfoides presentes en cada una de las muestras, se evaluó su aptitud siguiendo las pautas de O'Rourke *et al.* (2000), para posteriormente realizar la IHQ. Así se estableció como:

- Apta: a aquella muestra en que a la observación microscópica, se identificaron a lo menos 4 folículos linfoides.
- No apta: cuando en la muestra se identificaron menos de 4 folículos linfoides mediante la tinción H-E.

Para determinar si existe diferencia estadística entre los cortes de la mucosa rectal obtenidos a las distintas distancias desde la línea recto anal y su calidad de apta o no para realizar la IHQ, se utilizó la prueba de **ji cuadrado (χ^2)**, la que se aplicó de manera global y comparando la distribución entre pares de grupos de distancia de toma de muestra. Este estadígrafo se utilizó de forma manual, usando los recursos que entregan las planillas Excel de Microsoft.

También se realizó un estudio estadístico para para comparar el número de folículos linfoides entre pares de grupos de distancia de toma de muestra mediante una prueba U de Mann-Whitney. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0.05$. Para evaluar la correlación entre el número de folículos linfoides y la distancia a la línea recto-anal se

realizó un estudio de correlación de Spearson. La normalidad de la distribución de datos fue calculada mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El estudio estadístico fue aplicado usando el programa Graphpad InStat 3.0 software (Graphpad Software Inc., San Diego, California, USA).

Estudio inmunohistoquímico: la tinción positiva del tejido linfoide tanto del tercer párpado como de la mucosa recto anal, se reconoció por una inmunotinción citoplasmática de patrón granular en los centros germinales de los folículos linfoides, siguiendo las pautas de O'Rourke *et al.* (2000). Determinando una muestra como:

- Positiva: cuando en uno o más folículos se observaba el precipitado granular rojo, coincidente con la inmunotinción mencionada anteriormente.
- Negativa: cuando no se observó inmunotinción en el tejido, pero siempre que la muestra presentara el mínimo de 4 folículos linfoides requeridos para el diagnóstico.

La muestra que en esta etapa no cumplía con el requerimiento en número de folículos linfoides, fue clasificada como una muestra de tejido linfoide insuficiente para la determinación de proteína priónica, a través de IHQ (Thuring *et al.*, 2000; Farías *et al.*, 2009; O'Rourke *et al.*, 2011).

Todas las muestras analizadas en este estudio, se fotografiaron y describieron tanto aquellas clasificadas como aptas para este estudio, así como también algunas de las no aptas. Para esto se utilizó un microscopio Axio Imagen A1 (Zeiss), al cual va unida una cámara fotográfica digital (Canon PowerShot G6).

4.- RESULTADOS

4.- RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos planteados, se realizaron los siguientes pasos secuenciales con sus respectivos ensayos experimentales.

4.1. Obtención de las muestras

Para una correcta identificación, en la tabla 5 se describen la totalidad de ovinos de los que se obtuvieron las muestras de tejido linfoide utilizadas para este estudio, de acuerdo a su lugar de origen y tipo anatómico de tejido. Además de las 37 muestras de óbex de ovinos, que se utilizaron como controles para la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

Tabla 5. Estratificación del total de ovinos con muestras de tejido linfoide

Origen de muestras	Tercer párpado (Nº)	Mucosa rectal (Nº)	Obex (Control IHQ)	Total (Nº)
Matadero	44	100	0	144
Con signos clínicos compatibles	42	0	0	42
Centro de referencia	14	12	26	52
			19 (+) 18 (-)	19 18
Total (Nº)	100	112	63	275

4.2. Evaluación de la aptitud de las muestras de tejido linfoide

Previo a la realización de la técnica de IHQ, se procedió a evaluar la aptitud de todas las muestras de tejido linfoide, mediante la tinción Hematoxilina y Eosina (H-E), para confirmar la observación en cantidad suficiente de folículos linfoides con los centros germinales necesarios para el diagnóstico. Uno de los cortes de cada muestra, una vez procesado y teñido con H-E, fue observado en un microscopio óptico (Nikon HFX-DX), para describir las estructuras presentes.

La clasificación de aptitud, dependió del número de folículos linfoides observados. Así, para designar una muestra como apta se debían observar los folículos linfoides con centros germinales de cada corte histológico, ya que para determinar una muestra como negativa a scrapie por la técnica de IHQ, es

necesario que al menos existan 4 folículos linfoides y que en ninguno de estos se presente la reacción de inmunotinción. Siguiendo este criterio, las muestras no aptas fueron aquellas que presentaban menos de 4 folículos linfoides (O'Rourke *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008; Monleón *et al.*, 2011).

4.2.1. Aptitud de las muestras de tercer párpado

La totalidad de las muestras de tercer párpado se analizaron con la tinción de H-E, permitiendo así su clasificación en muestras aptas o no aptas, basados en la observación microscópica, para continuar con el protocolo de la IHQ sólo con las aptas. En la figura 4.1, se muestran dos de las microfotografías obtenidas, a) una muestra apta, en la que es posible observar el tejido linfoide y la presencia de numerosos folículos linfoides y b) otra de no apta, donde no se observan los folículos linfoides necesarios, aunque es posible diferenciar las estructuras presentes en este tejido.

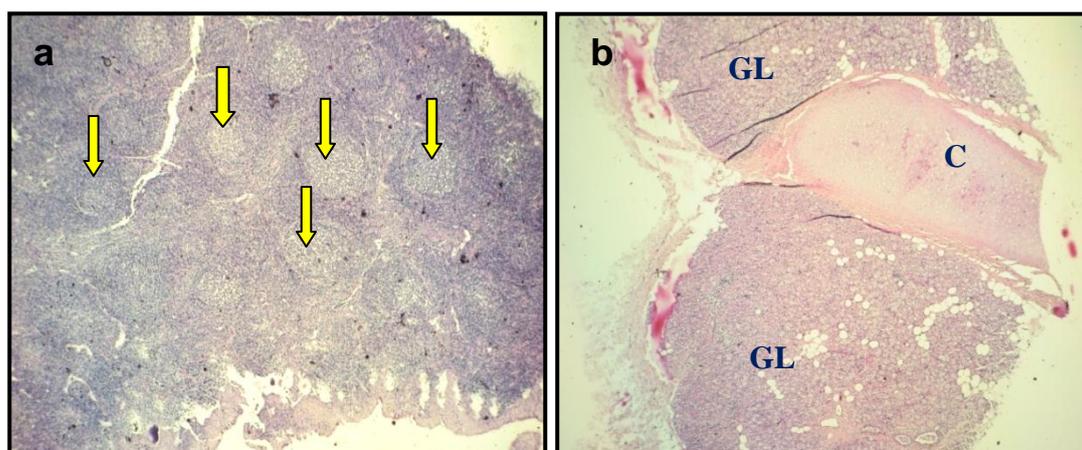


Figura 4.1. Microfotografías de cortes de tercer párpado de ovino. a) muestra apta, se observa el tejido linfoide y en él áreas circulares con centro pálido, correspondiente a folículos linfoides (flechas), necesarios para determinar una muestra como apta (H-E 100x). **b)** muestra no apta, se observan restos de glándula lagrimal (GL) y de cartílago (C) estructural (H-E 40x).

En la tabla 6, se resumen los resultados obtenidos en esta etapa de clasificación. Así, del análisis mediante la tinción de H-E de todas las muestras de tercer párpado (100), se obtiene un total de 81 muestras aptas (67 nacionales y 14 de validación del CR), para continuar con la IHQ y 19 de no aptas, de las cuales solamente en 3 no fue imposible identificar la presencia de folículos linfoides.

Tabla 6. Clasificación de aptitud de las muestras de tercer párpado de ovinos, de acuerdo a la observación con la tinción de H-E.

N° muestras	No aptas				Aptas		Total
	0	1	2	3	4	> 4	
N° folículos linfoides	0	1	2	3	4	> 4	
De matadero	2	2	5	5	14	16	44
Con signos clínicos compatibles	1	1	1	2	11	26	42
Centro de referencia					4	10	14
Total	19				81		100

En términos solo de individuos nacionales, del total de 86 ovinos muestreados en el país, 67 (77,9%) resultaron aptos y 19 (22,1%) no aptos, para realizar el diagnóstico por IHQ.

4.2.2. Aptitud de las muestras de mucosa rectal

Se evaluó la aptitud de todas las muestras de mucosa rectal, mediante la tinción H-E, en relación a la observación microscópica del número suficiente de folículos linfoides para el diagnóstico. Se consideraron como aptas, aquellas que presentaron un número mayor o igual a 4 folículos linfoides en el tejido, las que luego se sometieron al protocolo de IHQ. En la figura 4.2, se presentan dos de las microfotografías obtenidas, a) una muestra apta, en la que es posible observar el tejido linfoide y la presencia de numerosos folículos linfoides y b) otra no apta, donde no se observan los folículos linfoides necesarios, aunque es posible diferenciar las estructuras de este tejido.

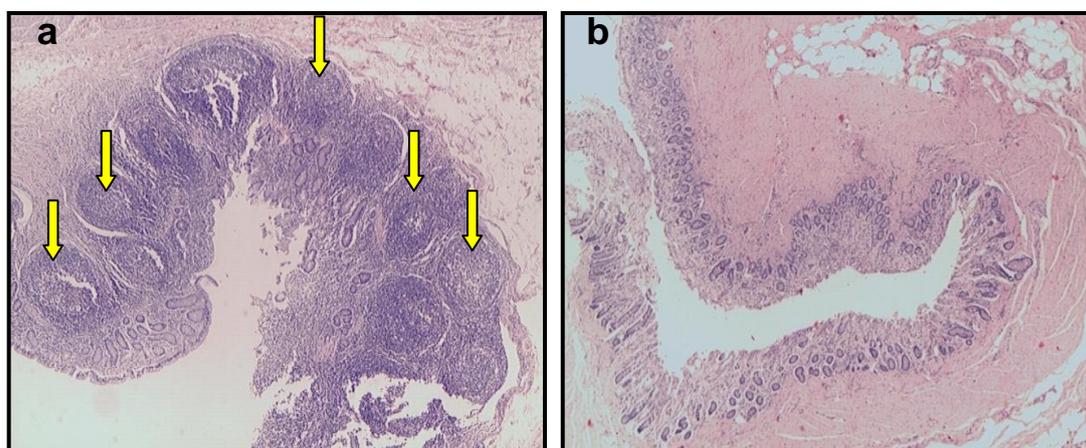


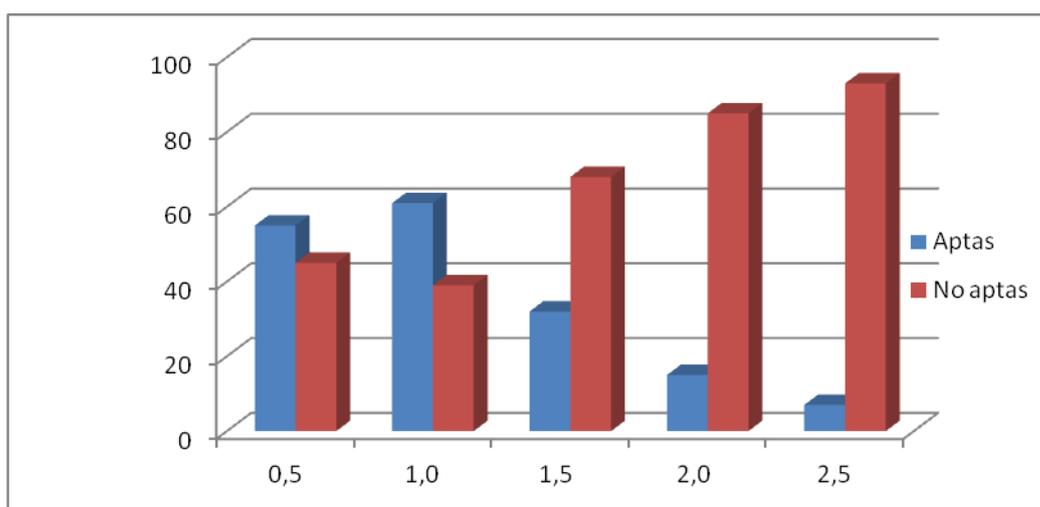
Figura 4.2. Microfotografías de cortes de la mucosa rectal de ovino. a) muestra apta, se observa el tejido linfoide y en él áreas circulares con centro pálido, que corresponden a los folículos linfoides (flechas), necesarios para determinar una muestra como apta (H-E 100x). **b)** muestra no apta, en que no se observan folículos linfoides (H-E 40X).

En la tabla 7, se puede observar la distribución de las muestras nacionales aptas y no aptas a las distintas distancias de la línea rectoanal. En el Gráfico 1, se puede apreciar el aporte porcentual de cada distancia analizada, tanto para las muestras aptas como para las no aptas, respectivamente.

Tabla 7. Clasificación de aptitud de las muestras nacionales de mucosa rectal de ovinos, obtenidas a las diferentes distancias desde la línea rectoanal, de acuerdo a la observación con la tinción de H-E.

Aptitud \ Distancia	0,5cm	1cm	1,5cm	2cm	2,5cm	NºTotal
Aptas	55	61	32	15	7	170
No aptas	45	39	68	85	93	330
NºTotal	100	100	100	100	100	500

Gráfico 1. Porcentaje de muestras aptas y no aptas para la realización de IHQ, a las diferentes distancias (cm) de la línea rectoanal.



De acuerdo a la distribución de las muestras, se observa que la mayoría de los cortes aptos están agrupados entre las distancias de 0,5cm hasta 1,0cm desde la línea rectoanal, correspondiente a la zona más caudal del recto. Así también se puede evidenciar que el mayor número de muestras no aptas, se agrupan en los cortes obtenidos entre las distancias 1,5 a 2,5cm desde la línea rectoanal, siendo esta la zona más craneal del recto. En la tabla del anexo 5a, se presenta el registro de todas las muestras aptas y no aptas obtenidas, para las diferentes distancias tomadas desde la línea rectoanal, en cada uno de los

ovinos nacionales estudiados, y en el anexo 5b el número de folículos linfoides en cada muestra.

En la tabla 8, se resume la distribución para esta etapa de clasificación de todos los individuos (112) según la aptitud de las muestras obtenidas, tomando en cuenta que se consideró ovino apto para el diagnóstico, todo aquel en que al menos una de sus cinco muestras recogidas, que fueron analizadas en este estudio, se clasificara como apta. Así, del análisis mediante la tinción de H-E se obtiene un total de 88 ovinos con muestras aptas (76 nacionales y 12 de validación del CR), para continuar con la IHQ y 24 de ellos con muestras no apta.

Tabla 8.

Origen	N° ovinos	No Aptas	Aptas	Total
	N° Folículos linfoides	< 4	≥ 4	
De matadero		24	76	100
Centro de referencia		0	12	12
Total		24	88	112

Clasificación de ovinos, según la aptitud de las muestras de mucosa rectal, de acuerdo a la observación con la tinción de H-E.

Del análisis de estos resultados, se puede concluir que, si bien de los 500 cortes obtenidos a nivel nacional, sólo 170 muestras fueron aptas para IHQ (Tabla 7, Gráfico 1). Sin embargo, en términos de individuos del total de 100 ovinos muestreados en el país, las muestras de 76 (76%) de ellos resultaron aptas para realizar la técnica de IHQ en este tejido y 24 (24%) no aptas.

Análisis Estadístico

Del total de las muestras de mucosa rectal nacionales observadas por medio de la técnica de H-E, se obtuvo un total de 170 cortes aptos para realizar los protocolos de IHQ y 330 que no lo eran. Para analizar estadísticamente, los datos obtenidos de la toma de muestra a las distintas distancias de la línea recto anal, se aplicó la prueba estadística de **ji cuadrado (χ^2)** (Taucher, 1997; Muñoz-Serrano, 2002). Esta prueba no paramétrica se utilizó tanto a nivel

general, así como para comparar la distribución entre pares de grupos de distancia de toma de muestra (Anexos 6b,c).

Del análisis de la tabla de contingencia, entre la aptitud de la muestra con la distancia de corte de la mucosa a la línea recto anal y del *ji* cuadrado (χ^2), que se refiere a la asociación entre los dos criterios de la tabla, se puede concluir que, efectivamente existe una fuerte asociación $\chi^2= 103,0413$ ($P<0,0001$) (Anexo 6) (Taucher, 1997; Muñoz-Serrano, 2002). Este resultado indica que, conforme nos alejamos de la línea rectoanal disminuye significativamente el porcentaje de muestras aptas, llegando a ser sólo del 7% a los 2,5cm. El estudio de correlación confirmó una clara correlación negativa entre la distancia a la línea rectoanal y el número de folículos linfoides por muestra ($r=-0,89$, $P=0,03$).

Al realizar un análisis más detallado, comparando las distancias de dos en dos, se observaron los resultados, que se presentan en el anexo 6a (Tabla de contraste) (Muñoz-Serrano, 2002). De los cuales se puede concluir, que los porcentajes de aptos son estadísticamente iguales en las distancias 0,5 y 1 cm y a partir de ahí, van disminuyendo significativamente cada medio centímetro. La prueba U de Mann-Whitney demostró que había diferencias significativas ($P<0,05$) entre 0,5 y 1 cm, y diferencias muy significativas ($P<0,001$) entre estas dos distancias y distancias superiores a 1 cm (anexo 6c). Así, de acuerdo al análisis estadístico se puede recomendar como distancia óptima, para la obtención del tejido linfóide necesario para un diagnóstico efectivo, realizar una biopsia *in vivo* en la zona comprendida entre la distancia menor o igual a 1cm. Sin embargo, a la distancia de 1,5cm ya no es recomendable la biopsia, puesto que disminuye significativamente la probabilidad de encontrar 4 o más folículos linfoides, siendo en esta sólo del 32%, lo cual disminuye aún más conforme nos alejamos de la línea recto anal (2 y 2,5cm).

4.3. Detección de la proteína priónica en tejido linfóide de ovinos

Para analizar todas las muestras del estudio clasificadas como aptas, se realizaron diversos protocolos de IHQ. Para cada uno de ellos, se utilizó el corte homólogo de la muestra que fue depositado en el portaobjeto *ProbeOn*

plus (FisherBiotech®), los cuales poseen carga eléctrica que mejora la adherencia. El protocolo de inmunohistoquímica, se realizó siguiendo lo indicado por el *kit* Pullman (Monoclonal F99/97.6.1) (Machuca *et al.*, 2006; Farías *et al.*, 2009), siempre se utilizó un control positivo y uno negativo de óbex, además de al menos dos de las muestras de validación y sus respectivos óbex provenientes del centro de referencia.

4.3.1. Detección de la proteína priónica en las muestras de tercer párpado

En el primer ensayo con la técnica de IHQ se utilizaron 17 cortes de muestras aptas, obtenidas en el país. Sin embargo, éstas presentaron un problema durante el desarrollo de la inmunotinción, que correspondió al desprendimiento del tejido en 13 de ellas.

Debido a este problema, se procedió a obtener un segundo corte sólo con las 13 muestras desprendidas, los que fueron montados en portaobjetos silanizados para aumentar la adherencia del tejido (Fink, 1987) y descartar que, el inconveniente fuera el tipo de portaobjetos. A pesar de esta modificación, en este segundo ensayo se presentó el mismo problema. Así se estableció, que el tejido del tercer párpado presenta mayor dificultad para ser manejado en las condiciones utilizadas en forma rutinaria con otros tejidos, que sirven para diagnosticar esta enfermedad. En resumen, del total de las 17 muestras procesadas en la primera IHQ y después de la repetición, 9 fueron las muestras desprendidas, las que se sustituyeron por las contramuestras de tejido linfoide obtenidas del tercer párpado del otro ojo del mismo individuo. Todas estas, fueron analizadas como las demás muestras disponibles para el diagnóstico. Así, un total de 81 muestras aptas (67 nacionales y 14 de validación del CR) quedaron disponibles para el análisis inmunohistoquímico.

Debido a la importancia de estandarizar la técnica para el resto de las muestras, se procedió a modificar el siguiente paso que podría estar disminuyendo la adherencia del tejido. Así, se estudió el tipo y la forma de secado y se procedió a modificarlo. Para esto, en el siguiente ensayo se obtuvieron 2 cortes seriados de otras 9 muestras, realizando por una parte el

secado vertical sobre un papel absorbente, eliminando el secador de portaobjetos, llevándolos una vez secos en el papel directamente a la estufa y por otra, se utilizaron como controles de esta modificación, 9 cortes de las mismas muestras, pero procesados con el secado de rutina, el que incluye la utilización del secador de portaobjetos y no el secado con papel absorbente. Con la modificación realizada, se obtuvo una adecuada adherencia del tejido independiente del tipo de portaobjeto utilizado, esto permitió solucionar el desprendimiento y así establecer las condiciones óptimas, para continuar con la técnica de IHQ de todas las muestras.

De las 9 muestras aptas utilizadas en el tercer ensayo de IHQ, bajo la modificación del secado, la totalidad logró superar el proceso y se utilizaron en el diagnóstico de la PrP^{Sc}. Al observar los resultados obtenidos con las 9 muestras tratadas en las condiciones rutinarias de secado, 6 perdieron el tejido, lo que permitió decidir finalmente la modificación del secado.

El análisis microscópico de las 81 muestras de tercer párpado aptas para la IHQ indica que, la totalidad de las muestras aptas obtenidas en el país (67) resultaron negativas a la inmunotinción de la proteína priónica patológica, al no observarse inmunomarcaje en ninguno de los folículos linfoides del tejido. Por otra parte, de las 14 muestras de tejido linfoide de tercer párpado de validación aportadas por el centro de referencia, 7 fueron negativas y 7 positivas, en estas últimas se observó el inmunomarcaje en al menos uno de los cuatro folículos linfoides observados, lo cual coincidió en todos los casos con las muestras de los óbex correspondientes al mismo individuo. Además, todos los controles positivos de óbex de ovinos (9) utilizados para la IHQ presentaron inmunotinción, mientras que en los negativos (8) nunca se detectó.

A continuación, se presentan algunas de las microfotografías obtenidas, donde se observa la inmunotinción en las muestras positivas y la ausencia de ésta en las negativas. En la figura 4.3, se observan dos de las muestras de tercer párpado estudiadas por la técnica de IHQ. En a) muestra aportada por el centro de referencia, se evidencia la inmunoreacción positiva de la proteína priónica,

con la visualización del inmunoprecipitado de color rojo en los centros germinales de los folículos linfoides, según la pauta descrita por O'Rourke *et al.* (2002). En b) muestra negativa obtenida en el país, en que no se observa inmunoprecipitado en los 4 folículos linfoides observados.

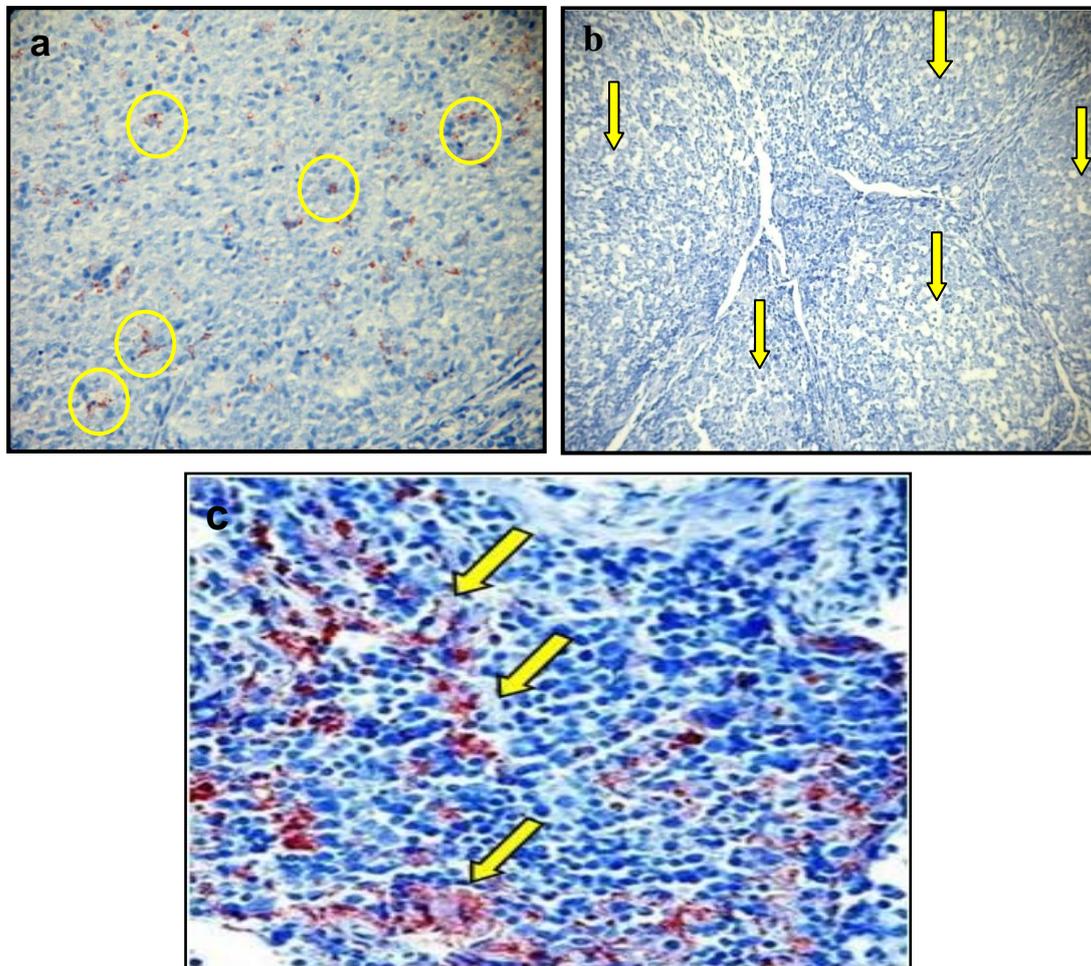


Figura 4.3. Microfotografías de cortes de tercer párpado. a) Muestra positiva, inmunoreacción de la proteína priónica patológica, evidenciada por el inmunoprecipitado rojo en el centro germinal del folículo linfoide (círculos) (IHQ 200x). **b)** Muestra negativa, ausencia de inmunomarcaje en los folículos linfoides (flechas) (IHQ 100x). **c)** Muestra positiva, detalle de la inmunoreacción del anticuerpo frente a la proteína priónica patológica, evidenciada por el inmunoprecipitado rojo en el centro germinal del folículo linfoide (flechas) (IHQ 400x).

La observación microscópica de la totalidad de las muestras aptas para la IHQ, permitió determinar satisfactoriamente la presencia de tejido linfoide del tercer párpado, tanto en las muestras en estudio obtenidas en el país como en las aportadas por el centro de referencia. Así, fue posible evidenciar la inmunoreacción tanto en los folículos linfoides de las muestras de validación positivas (7), como en sus respectivos óbex, además de los controles positivos

de óbex (9), aportados por el CR. Así como también la ausencia de la reacción en 74 de las muestras en estudio (67 nacionales y 7 de validación), en los óbex respectivos (7) y en los controles negativos de óbex (8) del CR.

En la figura 4.4, se observan los cortes de la médula oblongada a nivel de óbex de ovinos utilizados como controles para la IHQ, en a) uno positivo, donde se evidencia la inmunoreacción positiva de la proteína priónica patológica, como un inmunoprecipitado de color rojo y el patrón granular localizado en el citoplasma de neuronas, además de la visualización de numerosas vacuolas en el núcleo del tracto solitario y en b) uno negativo, con tinción de contraste hematoxilina de Mayer que hace posible evidenciar los somas neuronales.

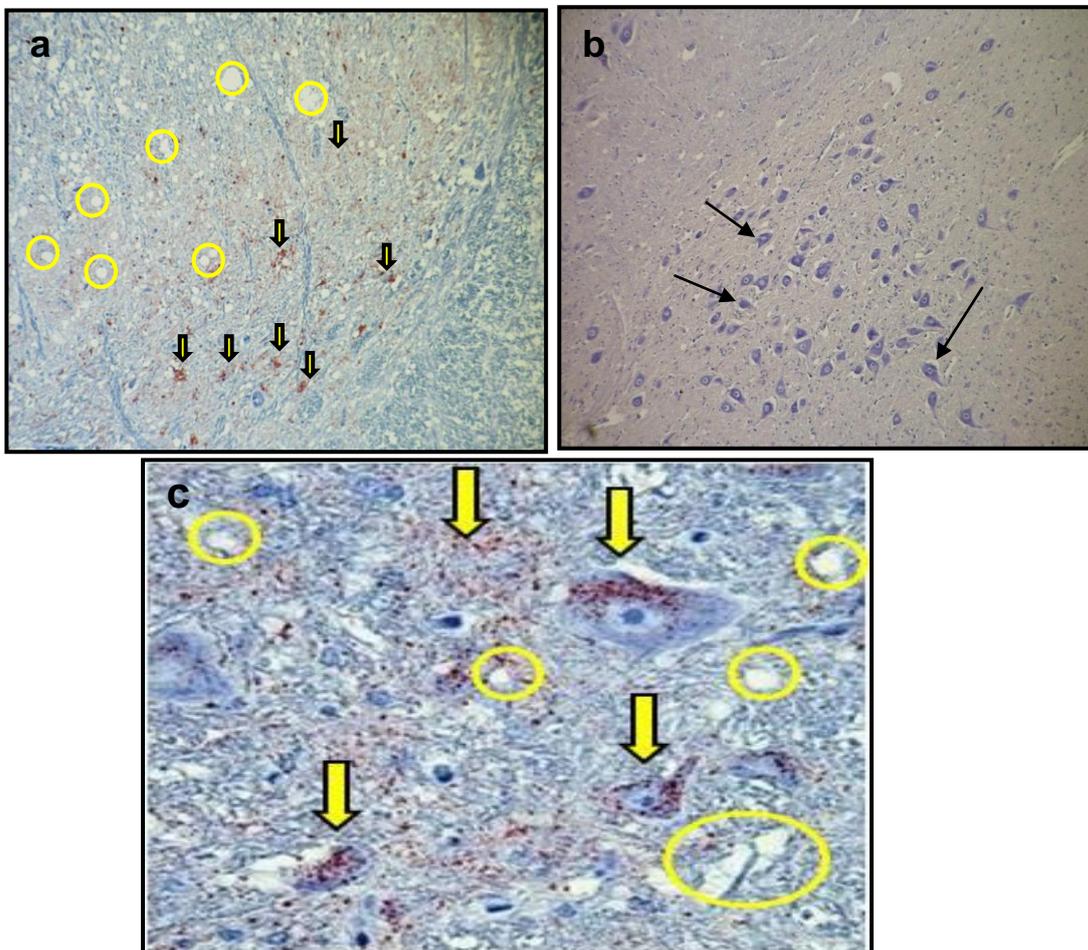


Figura 4.4. Microfotografías de cortes de óbex de ovinos. a) control positivo, se observa presencia de vacuolas a nivel del núcleo del tracto solitario (círculos) y el inmunoprecipitado rojo por la presencia de la PrP^{Sc} (flechas) (IHQ 200x). **b)** control negativo, no se observa presencia de inmunoprecipitado ni de vacuolas, pero sí los somas neuronales (flechas) (IHQ 200x). **c)** control positivo, detalle de corte a nivel del tracto solitario en el que se observa presencia de vacuolas (círculos) y la inmunotinción de patrón granular (flechas), localizada principalmente en el citoplasma de neuronas y en menor medida en neuropilo (IHQ 400x).

Una vez analizadas las 81 muestras aptas del tejido linfoide del tercer párpado, en la tabla 9, se resumen los resultados obtenidos mediante la IHQ de la totalidad de las muestras aptas, incluyendo las aportadas y los controles de óbex del laboratorio de referencia.

Tabla 9. Número de muestras aptas según su origen y resultado de IHQ, en tercer párpado ovino.

Origen de las muestras	IHQ Nº total	Positivas	Negativas
Nacionales			
Matadero	30	0	30
Con signos clínicos	37	0	37
Centro referencia			
Tercer párpado	14	7	7
Óbex respectivos	14	7	7
Control óbex	17	9	8
Total	112	23	89

La tabla 10, resume los resultados obtenidos con las muestras de tejido linfoide del tercer párpado de los ovinos estudiados por H-E e IHQ y de considerar las muestras que por no cumplir con el mínimo de folículos linfoides requeridos, se clasificaron como muestras no aptas para el diagnóstico por IHQ.

Tabla 10. Resumen del número de muestras de tercer párpado de ovinos, según técnicas de H-E e IHQ.

Muestras	Técnica	
	H-E	IHQ
Aptas	81	81
No aptas	19	0
Positiva	-	7
Negativa	-	74
Total	100	81

Los resultados obtenidos indican que la totalidad de los controles positivos de óbex (9), todos presentaron el precipitado granular rojo dado por la inmunoreacción de la PrP^{Sc} revelada con el cromógeno AEC, lo que indica la

localización de la PrP^{Sc} en los núcleos nerviosos afectados. En cambio, todos los controles negativos de óbex utilizados (8), ninguno presentó inmunotinción.

Con esto se demostró que del total de muestras de tercer párpado (100) obtenidas para este estudio, 81 fueron clasificadas como aptas por H-E para la determinación de la PrP^{Sc}, con el mínimo de folículos linfoides necesarios para el diagnóstico, correspondientes al 81%. De estas 74 (91,3%) resultaron negativas (67 obtenidas en el país y 7 de validación) y que sólo 7 (8,7%) de las de validación aportadas por el centro de referencia fueron positivas a scrapie.

De las muestras de tercer párpado obtenidas a nivel nacional de los 86 ovinos estudiados, 67 (77,9%) pudieron ser diagnosticados por IHQ y en 19 (22,1%) no fue posible realizar el diagnóstico.

4.3.2. Detección de la proteína priónica en las muestras de mucosa rectal

Una vez clasificadas las muestras de mucosa rectal, a través de la tinción de H-E, aquellas que se consideraron como aptas se sometieron a la técnica de IHQ, para esto se utilizó el corte homólogo depositado en el portaobjeto *ProbeOn plus* (FisherBiotech®), los cuales poseen carga eléctrica que mejora la adherencia de las muestras. Además se debe destacar que en estos protocolos se utilizó el secado modificado, con lo cual no se perdieron muestras por desprendimiento de tejido. En estos cortes se realizó el protocolo de inmunohistoquímica, siguiendo lo indicado por el *kit* Pullman (Monoclonal F99/97.6.1), para lo cual se utilizaron los controles de óbex positivos (10) y negativos (10) aportados por el centro de referencia.

Así del análisis microscópico de las muestras del total de 112 individuos utilizados en este estudio, se obtuvo que en 88 de ellos (76 nacionales y 12 de validación del CR), fue posible observar que al menos una de las cinco muestras de mucosa rectal obtenidas fue considerada apta y que 24 ovinos (todos nacionales) no presentaron muestras aptas en ninguno de sus cortes (Anexo 5). Sin embargo, en términos de individuos nacionales (100), 76 fueron aptos para realizar el diagnóstico de scrapie por la técnica de IHQ, los que

corresponden al 76% del total de los ovinos muestreados en el país. De estos 76 ovinos ninguno reunió los 5 cortes aptos para IHQ; pero 5 individuos presentaron 4 de las muestras aptas; 25 mostraron 3 cortes aptos, 29 con 2 secciones aptas y 17 individuos con al menos 1 de los cortes apto, con un total de 170 muestras de mucosa rectal de ovinos nacionales para analizar, además de las 12 muestras ciegas de validación aportadas por el centro de referencia. A continuación, se presentan las microfotografías representativas obtenidas, donde se evidencia la inmunoreacción en las muestras positivas y la ausencia de esta en las negativas. En la figura 4.5, se observan dos de las muestras de mucosa rectal analizadas por la técnica de IHQ. En a) una muestra positiva aportada por el centro de referencia, en que se observa la inmunoreacción positiva de la proteína priónica, con la visualización del inmunoprecipitado de color rojo en los folículos linfoides, según la pauta descrita por O'Rourke *et al.* (2002). En b) una muestra negativa de mucosa rectal, obtenida en el país, en que no se observa inmunoprecipitado en los 4 folículos linfoides observados.

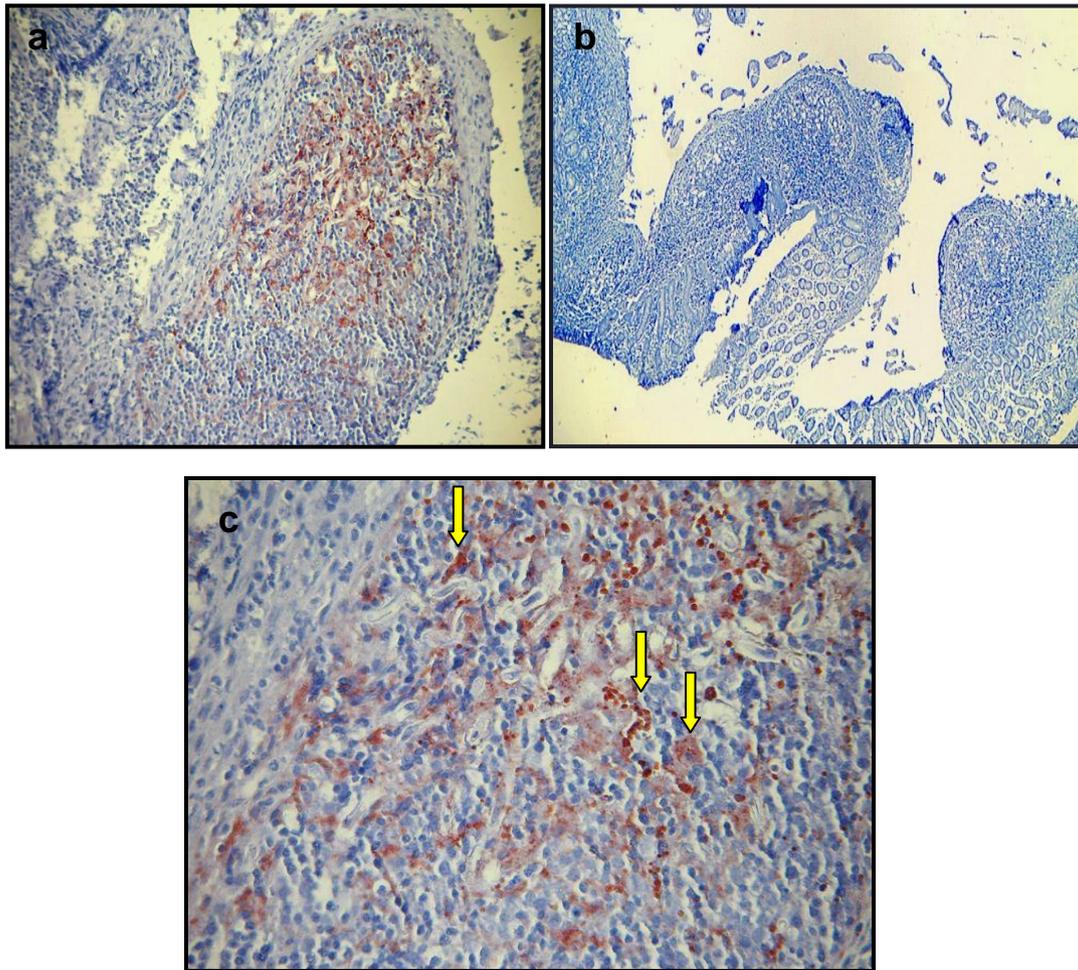


Figura Nº 4.5. Microfotografías de cortes histológicos de la mucosa rectal. a) muestra positiva, se observa el precipitado granular rojo en el centro germinal del folículo linfoide, que corresponde a la inmunotinción de la proteína priónica patológica (IHQ 100X). **b)** muestra negativa, se observan los folículos linfoides y en ninguno de ellos se visualiza precipitado granular rojo, lo que indica la ausencia de proteína priónica (IHQ 40X). **c)** muestra positiva, detalle del corte en el que se observa la presencia de la inmunotinción de patrón granular en el folículo linfoide (flechas) (IHQ 400x).

La observación microscópica de la totalidad de las muestras aptas para la IHQ, permitió determinar satisfactoriamente la presencia de tejido linfoide en la mucosa rectal, tanto en las muestras en estudio obtenidas en el país como en las de validación aportadas por el centro de referencia. De esta forma, fue posible evidenciar la inmunoreacción en los folículos linfoides de las muestras de validación positivas (6) y en los óbex respectivos (6), así como en los controles positivos de óbex (10), aportados por el centro de referencia. Así como también, la ausencia de reacción en las muestras nacionales en estudio (170) correspondientes a 76 ovinos, en las de validación negativas (6) y en los óbex respectivos (6), además de los controles negativos de óbex (10).

En la figura 4.6, se presentan los controles positivos y negativos utilizados para los protocolos de estas IHQ, en la cuales es posible observar los cortes de óbex de ovinos en a) uno positivo, donde se evidencia la inmunoreacción positiva de la proteína priónica patológica, como un inmunoprecipitado de color rojo, además de la visualización de numerosas vacuolas y en b) uno negativo que con la tinción de contraste, hematoxilina de Mayer, hace posible evidenciar algunas estructuras como los somas neuronales.

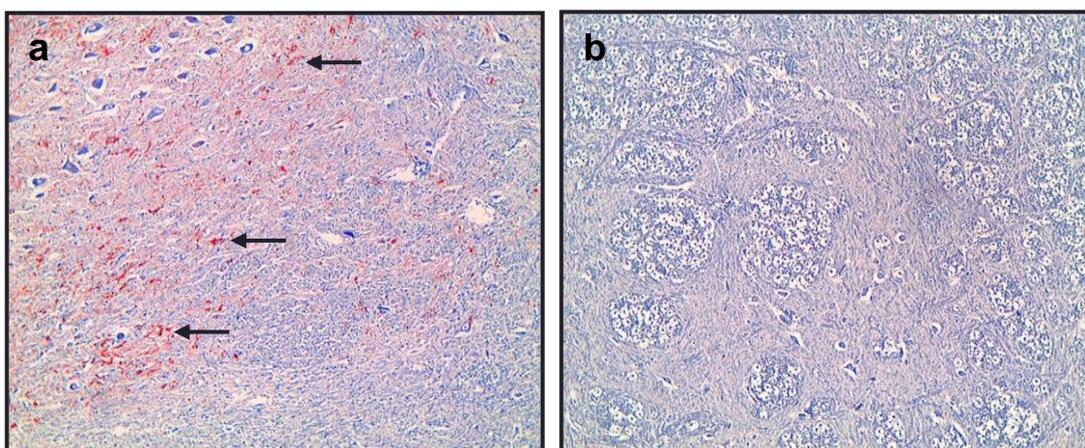


Figura Nº 4.6. Microfotografías de cortes histológicos de óbex ovino. a) control positivo, se indica la presencia del precipitado granular rojo (flechas), correspondiente a la inmunotinción de la proteína priónica patológica (IHQ 200X). **b)** control negativo, en el cual no se observa el precipitado granular rojo lo que indica la ausencia de proteína priónica en el tejido (IHQ 100X).

Una vez analizadas las 182 muestras aptas totales del tejido linfoide de mucosa rectal, en la tabla 11, se presenta el resumen de los datos con los resultados obtenidos al realizar la técnica de IHQ, en todas las muestras aptas tanto nacionales como en las aportadas por el centro de referencia. Además de los controles positivos y negativos de óbex, utilizados en estos protocolos.

Tabla Nº 11. Número de muestras aptas según origen y resultado de IHQ en la mucosa rectal de ovinos.

Origen de Muestras	IHQ	Positivas	Negativas
Matadero nacional	170	0	170
Centro de referencia	12	6	6
Óbex respectivos	12	6	6
Control óbex	20	10	10
Total	214	22	192

De acuerdo al análisis de los resultados mostrados en esta tabla, se puede concluir que la totalidad de las muestras nacionales seleccionadas por medio de la tinción de H-E como aptas para la técnica de IHQ, resultaron negativas a scrapie al no presentar el precipitado granular rojo de la inmunotinción, en ninguno de los cuatro o más folículos linfoides examinados, lo cual concuerda con los controles negativos utilizados.

Para confirmar la realización correcta de esta técnica se utilizaron los controles de óbex positivos y negativos, provenientes del centro de referencia. Es así que de los 20 controles de óbex utilizados, los 10 positivos siempre presentaron inmunotinción, mientras que, en los 10 negativos nunca se detectó la presencia de algún precipitado producto de la inmunoreacción. Por lo tanto, de acuerdo a los protocolos recomendados y utilizados en este trabajo, 176 muestras de mucosa rectal fueron diagnosticadas como negativas a la presencia de proteína priónica patógena (PrP^{Sc}), las 170 que correspondieron a la totalidad de las muestras nacionales aptas para IHQ y en 6 de las del CR. Mientras que, las otras 6 muestras de mucosa rectal y sus óbex correspondientes provenientes del CR, resultaron positivas a scrapie por el protocolo de IHQ utilizado.

Con esto se demostró que del total de ovinos (112) utilizados en este estudio, 88 fueron clasificados como aptos (76 nacionales y 12 de validación del CR) para el diagnóstico de scrapie por IHQ en muestras de mucosa rectal. De estos 82 (93,2%) resultaron negativos (76 obtenidos en el país y 6 del centro de

referencia) y que solo 6 (6,8%) de los aportados por el centro de referencia fueron positivos.

En la tabla 12, se resumen todos los resultados obtenidos en muestras de tejido linfoide, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, de acuerdo al número de ovinos estudiados por los protocolos de H-E y de IHQ, para el diagnóstico.

TablaN° 12. Estratificación del número total de ovinos con muestras de tejido linfoide estudiados.

Ovinos	Tercer párpado (N°)	Mucosa rectal (N°)
Total (N°)	100	112
H-E Aptas	81	88
H-E No aptas	19	24
IHQ Diagnosticadas	81	88
Negativas	74	82
Positivas	7	6
Total (N°)	81	88

Así del total de 212 ovinos estudiados, 100 correspondieron a tercer párpado y 112 a mucosa rectal; en 81 de los de tercer párpado fue posible realizar el diagnóstico y no así en 19 de ellos; mientras que, en 88 de los de mucosa rectal se realizó el diagnóstico, pero en 24 no fue posible. Sin embargo, se debe destacar que todas las muestras aptas pertenecientes a los 143 ovinos nacionales (67 de tercer párpado y 76 de mucosa rectal), que se diagnosticaron por los protocolos de IHQ utilizados en este estudio, resultaron negativos a scrapie clásico.

5.- DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

Como se ha indicado, el scrapie es una enfermedad neurodegenerativa fatal que afecta a ovinos y caprinos, de progresión lenta y de replicación silente en su hospedador, lo que disminuye las posibilidades de detección temprana en los animales afectados (CRL, 2007; Tranulis *et al.*, 2011). El agente causal corresponde al prión (PrP^{Sc}), isoforma alterada de una proteína celular constitutiva de membrana, presente en la mayoría de los mamíferos (Prusiner, 1998; Watts *et al.*, 2006; Westergard *et al.*, 2007; DEFRA, 2008; Norrby, 2011).

Así, la habilidad de una detección temprana y segura es vital para que el diagnóstico del scrapie tenga un valor real, particularmente en animales destinados al consumo humano, en los que existe una exigencia adicional para determinar la presencia del prión en tejidos de animales de matadero de apariencia saludable y clínicamente asintomáticos, que son destinados a consumo (Monleón *et al.*, 2005; Aguzzi *et al.*, 2008). Estos métodos deben ser capaces de identificar los casos sospechosos en fases tempranas de la infección, característica que cumple el diagnóstico por inmunohistoquímica (IHQ) en el tejido linfoide (TL), tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, que permiten identificar a un animal positivo a scrapie desde los 10 meses de edad, es decir mucho antes del comienzo de los signos clínicos (O'Rourke *et al.*, 2000; Valdez *et al.*, 2003; Espénes *et al.*, 2006; Grassi *et al.*, 2008).

La PrP^{Sc} se ubica en los folículos linfoides del TL, pero como su distribución temprana no es homogénea, al realizar la IHQ se necesita examinar un número mínimo de al menos 4 folículos linfoides, para poder establecer un diagnóstico negativo fiable (O'Rourke *et al.*, 2000; Gavier-Widén *et al.*, 2005). Así queda de manifiesto la gran utilidad e importancia para el país, que adquiere la implementación, aplicabilidad y validación de la técnica de IHQ en tejido linfoide de ovinos, permitiendo con esto en un futuro cercano aplicarla al diagnóstico de la enfermedad, en la etapa preclínica o clínica de animales sospechosos (Baylis y McIntyre, 2004; González *et al.*, 2006; Monleón *et al.*, 2011).

Al analizar la evolución de los diferentes métodos diagnósticos para el scrapie, se debe destacar que antes que ocurriera la epidemia de EEB, éste no tenía importancia desde el punto de vista de salud pública o económico y se basaba en el análisis de los signos clínicos y posterior observación de las lesiones histopatológicas características (espongiosis, astrogliosis, placas amiloides) (Dustan *et al.*, 2008; Konold *et al.*, 2010b). Con el desarrollo de las técnicas inmunológicas el diagnóstico se hizo más específico, ya que permitió la observación directa de las lesiones típicas (histopatología), además de aumentar notablemente su sensibilidad al utilizar anticuerpos específicos contra la PrP^{Sc} (inmunohistoquímica), utilizándose esta de manera exitosa.

Por otra parte, también es posible caracterizar la cepa del prión involucrada en la enfermedad (*Western Blot*), a través de la identificación de los patrones moleculares de las tres glicofomas de la PrP^{Sc} y la reacción con anticuerpos específicos (Loiacono *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011). Sin embargo, el método de detección más sensible y específico para diagnosticar las EETs sigue siendo la infección experimental de animales de laboratorio, en los que se observan los signos clínicos de la enfermedad y las lesiones *post mortem* (Kratzel *et al.*, 2007; Grassi *et al.*, 2008; Konold *et al.*, 2010a), pero estos métodos requieren más tiempo y no permiten diagnosticar al animal *in vivo*, es decir en la etapa preclínica de la enfermedad, además que sería laborioso y costoso su aplicación a una población muy grande de animales.

Posteriormente, se desarrollaron las llamadas pruebas “rápidas” basadas en la detección inmunológica de la PrP^{Sc} y diseñadas para lograr un diagnóstico simple y rápido de las EETs. La mayoría de estas pruebas al distinguir tanto la isoforma normal como la patológica, necesariamente deben ser realizadas sobre muestras tratadas con proteinasa K o con detergentes, logrando así la denaturación total de la PrP^C y sólo parcial de la PrP^{Sc} (Machuca *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2009), a pesar que en la actualidad ya existen algunos laboratorios que han logrado eliminar esta etapa (Tattum *et al.*, 2010; Pirisinu *et al.*, 2011). Cualquiera de estas técnicas, permiten el diagnóstico adecuado de la enfermedad, es así como se describe que con el ELISA se puede alcanzar un

100% de sensibilidad y de especificidad (Grassi *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de la certeza y rapidez de estas técnicas, al ser aplicables sólo en tejidos de animales obtenidos post mortem, es poco factible su uso en la etapa preclínica de la enfermedad. Otros estudios, han buscado marcadores alternativos que permitan el diagnóstico de las EETs, especialmente con aquellas técnicas que presenten una menor invasión del individuo en las etapas tempranas de la infección, permitiendo así la detección precoz del prión. Entre éstos, se encuentran marcadores neuronales y metabólicos pero hasta ahora ninguno es lo suficientemente sensible y específico para ser utilizado en el diagnóstico preclínico de la enfermedad (Parveen *et al.*, 2005; Grassi *et al.*, 2008; Vulin *et al.*, 2011).

En el scrapie clásico, el desgaste crónico y la variante del Creutzfeldt-Jakob, en las que de acuerdo a su patogenia, la PrP^{Sc} se acumula antes en el TL y luego en el SNC, por ende la detección de la PrP^{Sc} en biopsias del tejido linfoide parece ser un método fiable para el diagnóstico preclínico, puesto que la expresión de la proteína priónica alterada en estos tejidos ocurre antes que la neurológica (Monleón *et al.*, 2005; McGovern y Jeffrey, 2007; Aguzzi *et al.*, 2008; Tranulis *et al.*, 2011). Sin embargo, no existe asociación de lesiones patológicas típicas en el TL, en contraste con el SNC donde las lesiones son bien conocidas, lo que remarca la eficacia de la detección inmunológica (O'Rourke *et al.*, 2000; Jeffrey y González, 2007; van Keulen *et al.*, 2008a; Vidal *et al.*, 2009), pero presenta el inconveniente que puedan aumentar los falsos negativos, alcanzando diferentes porcentajes de sensibilidad (O'Rourke *et al.*, 2002; Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Monleón *et al.*, 2011).

El diagnóstico preclínico del scrapie, en su mayoría ha sido probado en muestras de tejido linfoide de biopsias de amígdalas palatinas, tercer párpado, nódulos linfáticos superficiales, entre otros. Sin embargo, la obtención de estas muestras presenta inconvenientes técnicos como el uso de tranquilizantes o anestesia, lo cual dificulta el manejo y su utilización para grandes poblaciones de ovejas. No obstante, los folículos linfoides están presentes en el tercer párpado así como en todo el intestino de la oveja, incluso en el extremo distal

de la mucosa rectal, ambos lugares son más accesibles para obtener una biopsia *in vivo*, su posterior estudio inmunohistoquímico y el diagnóstico del animal (Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2010).

En este estudio se utilizaron ambas muestras de tejido linfoide, pero previo a la IHQ se procedió a seleccionar a través de la tinción de H-E sólo aquellas muestras aptas para el diagnóstico, en relación al mínimo de folículos linfoides necesarios (O'Rourke *et al.*, 2000), logrando así optimizar la utilización de los *kits* de IHQ. Esto permitió establecer que no todas las muestras obtenidas presentaban el número mínimo de folículos linfoides (Tablas 6 y 8), teniendo en cuenta la irregular distribución del tejido linfoide y a la escasa cantidad de los mismo en los ovinos estudiados. En relación a la muestra de tercer párpado, Thuring *et al.* (2000), proponen realizar en animales vivos un pretratamiento con histamina en la mucosa del párpado, con lo cual se logra aumentar de manera significativa las muestras aptas que se obtienen (Bender *et al.*, 2004).

Los agregados linfoide presentes tanto en tercer párpado como en la mucosa rectal no son perceptibles a simple vista, por lo que es posible que las muestras de la biopsia puedan no ser adecuadas para los fines diagnósticos. Al analizar la clasificación de aptitud de las muestras de tercer párpado, los resultados obtenidos en este estudio revelan que se logró obtener un 81% de muestras aptas (81/100) disponibles para la IHQ, o bien si se consideran sólo las nacionales aptas un 77,9% (67/86), lo que supone porcentajes ligeramente inferiores al 81,9% obtenido por Monleón *et al.*, (2011) y al 85% de los estudios de O'Rourke *et al.*, (2000; 2002). En este sentido, en la mucosa rectal obtuvimos un 78,6% de aptitud (88/112), o un 76% sólo con las muestras aptas nacionales (76/100), ambos porcentajes mayores al 66,7% descrito por Monleón *et al.*, (2011), pero menor al 87% de Espénes *et al.*, (2006), aunque este último no hace diferencia en el número mínimo de folículos y se incluyen como muestras aptas todas las que presentan desde un folículo linfoide. Estas diferencias se pueden atribuir por una parte a la dificultad en la obtención del tejido necesario en las primeras muestras, debido a inexperiencia y por otra, a la distribución irregular del tejido linfoide en el tercer párpado y la mucosa rectal

(Thuring *et al.*, 2000; Bender *et al.*, 2004; González *et al.*, 2008). Sin embargo, fue posible determinar correctamente la aptitud de las muestras tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal de los ovinos estudiados en cortes histológicos teñidos con H-E.

Por otra parte, en las muestras de mucosa rectal nos propusimos observar las posibles diferencias de la toma de muestra a distintas distancias de la línea recto anal, en relación a la obtención del número de muestras aptas con H-E. Es así como, en este estudio se planteó estandarizar la ubicación anatómica para la obtención de TL y además que esté presente la cantidad necesaria de folículos linfoides (≥ 4), que permitan considerar una muestra de mucosa rectal como apta para realizar la técnica diagnóstica de IHQ (O'Rourke *et al.*, 2000; Espénes *et al.*, 2006; Monleón *et al.*, 2011). Los resultados del análisis estadístico mediante la prueba ji cuadrado, demostraron una fuerte asociación estadística ($\chi^2 = 103,0413$, $P < 0,0001$) entre las distintas distancias de toma de muestra para una biopsia *in vivo* y la aptitud de las biopsias para la IHQ, siendo las distancias entre 0,5 y 1cm desde la línea recto anal, el lugar donde se encontró la mayor cantidad de folículos linfoides, resultados que fueron consistentes con los descritos por González *et al.*, (2008), por lo que distancias superiores a 1,5 y hasta 2,5cm no se consideran adecuadas, porque son las zonas donde se presentó el mayor porcentaje de muestras no aptas. El considerar las distancias recomendadas por este estudio para la toma de muestra en una biopsia *in vivo*, podría reducir la probabilidad de encontrar falsos negativos.

Puesto que, a pesar que se puede diagnosticar la enfermedad con un único folículo linfoide, en regiones como la estudiada con baja probabilidad de encontrar casos positivos a scrapie, es necesaria la observación de al menos 4 folículos linfoides para diagnosticar correctamente una muestra como negativa. Si bien la PrP^{Sc} se ubica en los folículos linfoides del TL, se describe que su presencia temprana en este tejido no es homogénea, así provengan de tercer párpado o de mucosa rectal (Gavier-Widén *et al.*, 2005; van Keulen *et al.*, 2008b; Monleón *et al.*, 2011; O'Rourke *et al.*, 2011), y aunque la intensidad de

inmunotinción varía de forma individual entre las ovejas, ésta no se relacionaría con la edad ni su estado clínico. El examen histológico permitió establecer que no todas las muestras obtenidas de TL, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, presentaban el número mínimo de folículos linfoides necesarios para un correcto diagnóstico.

La demostración de la acumulación de la PrP^{Sc} en biopsias de tejido linfoide presenta algunas limitaciones para identificar los animales infectados, principalmente porque el depósito en el SNC se puede encontrar incluso cuando no se afecte el TL. El grado de participación de éste tejido en la patogenia del scrapie depende entre otras variables de la edad, la genética, la dosis de infección y la cepa del agente (O'Rourke *et al.*, 2000; Jeffrey y González, 2007; González *et al.*, 2008). En relación a la influencia de la edad sobre el número de folículos linfoides en el TL, en muestras de tercer párpado o de mucosa rectal, se ha establecido que éstos presentan una regresión con la edad, por lo que se esperaría encontrar un menor número de folículos linfoides en ovejas de más de 5 años, lo mismo ocurriría en animales de menos de 2 años de edad, lo cual podría comprometer la eficacia de las biopsias tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, como muestras para el diagnóstico de scrapie (Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2006; Monleón *et al.*, 2011). Sin embargo, en este estudio esta variable fue disminuida, puesto que se seleccionaron animales entre los 2 y 4 años de edad, período en el cual es posible detectar clínicamente la enfermedad, con un tiempo de incubación de al menos 1 año (Gavier-Widén *et al.*, 2005; van Keulen *et al.*, 2008b), esto nos permitió incluir el rango de edad de las ovejas de mayor riesgo, en las que además el número de folículos linfoides es más homogéneo entre los animales.

El hecho de que una muestra de biopsia de TL no contenga folículos linfoides o éstos sean escasos, no significa que el resultado sea un falso negativo, puesto que esto dependerá de la prevalencia del scrapie en el rebaño de ovejas estudiado, la que puede estimarse a partir de la proporción de casos positivos a la biopsia (Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008). Además, como en cualquier otra prueba de diagnóstico, un resultado negativo individual nunca

puede ser considerado como prueba de ausencia de la enfermedad, sino que éstos deben ser evaluados a la luz de pruebas repetidas a nivel individual y del rebaño (Vargas *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Monleón *et al.*, 2011).

Respecto a la obtención de tejido linfoide *in vivo* la biopsia rectal tiene claras ventajas prácticas respecto a la del tercer párpado, de amígdala palatina u otra. El procedimiento es más sencillo, rápido y no tiene efectos adversos, incluso los animales se comportan normalmente después de la biopsia, las que pueden tomarse en ocasiones repetidas de la misma oveja, sin disminuir su bienestar o el número de folículos obtenidos. Además, no son necesarias la anestesia ni la sedación, las herramientas usadas en este tipo de biopsia son desechables, de bajo costo y su utilidad además del scrapie en ovinos, pueden aplicarse también a caprinos y cérvidos (Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008).

Por otra parte, otros estudios realizan estas pruebas comparando el genotipo de los ovinos, puesto que como se ha descrito se reconoce una base genética que determina la resistencia o baja prevalencia al scrapie clínico (Jeffrey y González, 2007; Benestard *et al.*, 2008). Esto se debe a la dinámica de replicación del prión, que puede estar influenciada por diferentes variables, una de ellas son las diferencias genotípicas del hospedador (Fediaevsky *et al.*, 2008; Ortiz-Pelaez y Bianchini, 2011), sin embargo, en rebaños de genética similar la diferencia más importante apuntaría al tipo de prión. Así por ejemplo, ensayos realizados por González *et al.*, (2006), muestran que la PrP^{Sc} puede ser detectada constantemente por IHQ en el TL, durante la etapa preclínica o clínica independiente del genotipo de la PrP de los individuos, con excepción de los VRQ/ARR que presentan un leve efecto perjudicial, este genotipo por las razas utilizadas en este estudio aparentemente no estuvo presente.

Los resultados de la IHQ obtenidos en este estudio, al comparar muestras tanto de tercer párpado como de la mucosa rectal con las del óbex del mismo individuo, confirman la especificidad de un 100% descrita para esta técnica en el diagnóstico de scrapie utilizando TL obtenido de tercer párpado o de mucosa rectal, respecto a la técnica estándar de confirmación *post mortem* reconocida

por la OIE (O'Rourke *et al.*, 2002; Monleón *et al.*, 2005; Espénes *et al.*, 2006). Sin embargo, la sensibilidad descrita para éste método es muy diversa y se describe entre un 44 a 48% (Monleón *et al.*, 2011) hasta un 97,6% (O'Rourke *et al.*, 2000), dependiendo del número y la edad de los ovinos utilizados. Por esta razón, debe realizarse en conjunto con un programa de selección u otro método confirmatorio. Es así como algunos países que poseen la enfermedad de manera endémica, tienen entre sus estrategias de control el monitoreo de animales vivos mediante este tipo de biopsia (Detwiler y Baylis 2003; Mitchell *et al.*, 2011). En este estudio inicialmente descartamos algunos factores como el tamaño inadecuado de la muestra y la edad de los ovinos, que en este caso fue homogénea entre los 2 a los 4 años de edad, por lo que los falsos negativos podrían deberse a la ausencia o escasa cantidad de PrP^{Sc}, a la distribución no homogénea de ésta en el TL (van Keulen *et al.*, 2008a), o a la aparición de nuevas cepas de scrapie. Así como la Nor98, descrita en países y continentes en que se suponía controlada la enfermedad clásica, que difiere del scrapie típico tanto en su presentación clínica como en la patogenia y el linfotropismo del prión, ya que se postula que después de su ingreso por vía digestiva esta cepa invadiría directamente el SNC (Benestad *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2010; Tranulis *et al.*, 2011). El inconveniente que puedan existir falsos negativos alcanzando los diferentes porcentajes de sensibilidad (O'Rourke *et al.*, 2002; Monleón *et al.*, 2011), se debería a la dinámica de replicación del prión, que puede estar influenciada por distintos factores. Los falsos negativos en el estudio del TL por IHQ no serían por un problema de reconocimiento, sino de la presentación individual de la enfermedad como manifestación directa del tipo de cepa de PrP^{Sc} involucrada (Kübler *et al.*, 2003; Gavier-Widén *et al.*, 2005; Benestard *et al.*, 2008; van Keulen *et al.*, 2008b).

El scrapie es endémico en Europa y Norteamérica, lo cual llevó a la instauración de programas de vigilancia activa en el año 2002 en Europa y el desarrollo de programas acelerados de erradicación el año 2000 por Estados Unidos (APHIS, 2004; Baylis y McIntyre, 2004; OIE, 2007; Fediaevsky *et al.*, 2008). En Chile, debido a que nunca ha sido diagnosticada la enfermedad, los programas de vigilancia realizados son sólo de tipo pasivo e incluso no son

especificados ante la autoridad sanitaria pertinente (OIE, 2007). Sin embargo, al estudiar la realidad del scrapie, que de acuerdo a lo descrito originó la epidemia de EEB en Europa, queda de manifiesto la importancia de establecer nuevas medidas de vigilancia para la enfermedad en el país, puesto que en este continente el scrapie fue diagnosticado en Brasil el año 2007, por lo que Argentina y Ecuador ya realizan programas activos de vigilancia (OIE, 2007).

Actualmente para el diagnóstico del scrapie en el país se utilizan muestras *post mortem* del SNC, examinadas por histopatología en conjunto con la técnica de IHQ (Machuca *et al.*, 2006; Farías *et al.*, 2009). Sin embargo, debido a la presencia de cepas de esta enfermedad relacionadas con el genotipo de los animales y a la ausencia de monitoreos activos, para este país resulta de gran importancia el implementar programas utilizados actualmente por países que poseen la enfermedad de manera endémica y que basan fuertemente sus estrategias de erradicación, en el monitoreo de animales vivos mediante la biopsia de tejido linfoide, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal (APHIS, 2004). Además, la instauración de estas estrategias de vigilancia, permitiría al país contar con mayor información sanitaria respecto al scrapie, en la población ovina y caprina nacional.

Un punto de discusión importante, se refiere a la posibilidad de transmisión del scrapie hacia el humano, situación que es manifiesta y ha sido descrita con la aparición de la vECJ del humano a partir de la EEB, a través del consumo de productos cárneos contaminados (Colchester y Colchester, 2005; Vargas *et al.*, 2006; van Keulen *et al.*, 2008a; Wadsworth *et al.*, 2011). A pesar de esto, actualmente no existe evidencia que le otorgue al scrapie la posibilidad de ser transmitida al humano, sin embargo, lo que sí se ha demostrado es la transmisión del prión de la EEB a los ovinos, convirtiendo con esto al scrapie en una amenaza potencial para la salud humana (Detwiler y Baylis, 2003; Hunter, 2003; Pirisinu *et al.*, 2011; Tranulis *et al.*, 2011). Esta alerta es aún más marcada, si se analizan los resultados obtenidos en diversos estudios donde fue posible comprobar experimentalmente, en una primera instancia, la acumulación de priones de ovinos en músculo de hámsteres inoculados

intracerebralmente, para posteriormente y con resultados más sorprendentes comprobar la acumulación de la PrP^{Sc} en el tejido muscular de ovejas infectadas naturalmente (Hunter, 2003; Valdez *et al.*, 2003; Loiacono *et al.*, 2010). A esto se debe sumar la identificación por la *European Food Safety Authority* (EFSA) de dos variantes diferentes al scrapie tradicional, como son la EEB transmitida a los pequeños rumiantes y la Nor98 (Benestad *et al.*, 2008; Loiacono *et al.*, 2010; Mitchell *et al.*, 2010), las cuales por presentar una patogenia diferente a la cepa clásica, no permiten asegurar que no se comporten como zoonosis (van Keulen *et al.*, 2008b; Pirisinu *et al.*, 2011).

Así en este estudio, la observación microscópica de la totalidad de las muestras aptas para la IHQ, permitió determinar satisfactoriamente la presencia de tejido linfoide tanto en el tercer párpado como en la mucosa rectal, ya sea en las muestras obtenidas en el país como en las aportadas por el CR. En éstas fue posible evidenciar la inmunoreacción o inmunomarcaje en los folículos linfoides de las muestras positivas provenientes del centro de referencia, la ausencia de ésta en las negativas del mismo centro y en todas las muestras de TL obtenidas en matadero. Por otra parte, los resultados mostraron que en la totalidad de los cortes de la médula oblongada a nivel de óbex de ovinos, utilizados como controles para la IHQ, todos los positivos siempre presentaron el precipitado granular rojo, indicativo de la inmunoreacción del anticuerpo con la PrP^{Sc}, lo que indica su localización en los núcleos nerviosos afectados y la visualización de vacuolas en el núcleo del tracto solitario, los que en cambio nunca se observaron en los óbex de los controles negativos.

El protocolo de IHQ utilizado en este estudio, corresponde al que se dispone actualmente para el diagnóstico con muestras del SNC, pero que siguiendo las recomendaciones del fabricante del *kit* y a las descritas tanto para el tercer párpado (O'Rourke *et al.*, 2000; O'Rourke *et al.*, 2002; VMRD, 2004), como para la mucosa rectal (Espénes *et al.*, 2006; González *et al.*, 2008; Monleón *et al.*, 2011), se logró aplicar correctamente y con buenos resultados. Además se utilizó el anticuerpo monoclonal F99/97.6.1, específico para detectar la PrP^{Sc}

por IHQ (O'Rourke *et al.*, 2000; Valdez *et al.*, 2003) y el cromógeno AEC para revelar la inmunoreacción (Boenisch, 2001; Spraker *et al.*, 2002; VMRD, 2004), a pesar de que otros autores recomiendan utilizar la mezcla de anticuerpos monoclonales, para aumentar la detección de la PrP^{Sc} a través de la secuencia conservada de la PrP presente en las especies mamíferas que poseen EETs naturales (O'Rourke *et al.*, 2000, Spraker *et al.*, 2004; Aguzzi *et al.*, 2008). Sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias tanto en los controles positivos como negativos, con los resultados descritos por O'Rourke *et al.*, (2002), quienes utilizaron dos anticuerpos. Así, todas las muestras de tejido linfóide de tercer párpado y de la mucosa rectal de los ovinos obtenidas en el país, analizadas por IHQ resultaron negativas a la detección de la PrP^{Sc} puesto que no se observó la presencia de inmunotinción en los folículos linfoides. Sin embargo, lo que nos confirma que la metodología utilizada fue la correcta es la inmunorreacción observada en los controles positivos de óbex y en las muestras ciegas tanto de tercer párpado como de la mucosa rectal, que resultaron positivas y que en su totalidad correspondieron a las aportadas por el centro de referencia. Como en el tejido linfóide no es posible observar lesiones específicas indicativas de la presencia de priones, a diferencia del tejido nervioso, en las muestras aquí estudiadas se remarca la eficacia de la detección inmunológica para este agente.

En conclusión en este estudio, se analizó el TL obtenido tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal de ovinos entre los 2 a 4 años, para estandarizar la técnica independiente de la edad. Además, se clasificaron las muestras según su aptitud, con lo cual se logró implementar y aplicar correctamente la técnica de IHQ para la detección del scrapie en ovinos. Los resultados indican que las muestras de tercer párpado son adecuadas para el diagnóstico de scrapie, sin embargo, su obtención *in vivo* presentaría como dificultad el inmovilizar manualmente al animal y el utilizar anestesia local, por lo cual se invertiría más tiempo, mientras que las muestras de mucosa rectal son igualmente adecuadas para el diagnóstico de scrapie y su obtención por biopsias *in vivo*, a una distancia entre 0,5 y 1cm de la línea recto anal,

presentaría mejores resultados con menor dificultad y tiempo invertido, que otras técnicas, incluyendo las del tercer párpado para obtener muestras de TL.

El diagnóstico de scrapie por IHQ utilizando muestras de TL tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal, podrían constituir una importante herramienta de vigilancia y control de la enfermedad, aunque como la sensibilidad no es 100%, ésta debe realizarse en conjunto con un programa de selección u otro método confirmatorio. Así, la instauración de estas estrategias de vigilancia, permitiría a regiones como la estudiada, en que la enfermedad no se ha descrito, contar con mayor información sanitaria respecto al scrapie ovino y además, disponer entre sus estrategias de control, el monitoreo de animales vivos mediante las biopsias del TL. En este trabajo se logró implementar y aplicar la técnica de IHQ en muestras de TL tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal de ovinos, en el laboratorio de referencia para el diagnóstico oficial del scrapie en el país, la que podría aplicarse en la etapa preclínica o clínica de la enfermedad de animales sospechosos, sin involucrar su sacrificio (Espénes *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2009; Monleón *et al.*, 2011). Los resultados nos permiten recomendar su implementación y aplicación para un primer *screening in vivo* de los animales, incorporadas a programas de vigilancia y control del scrapie.

Con el cumplimiento de los objetivos de este estudio, en que se logró implementar, aplicar y validar la técnica de IHQ con muestras de tejido linfoide tanto de tercer párpado como de mucosa rectal de ovinos, en el laboratorio de diagnóstico de referencia para el país, queda abierto el camino para realizar futuros estudios en animales vivos con o sin sintomatología nerviosa, que permitan establecer programas de certificación de planteles libres de la enfermedad, bajo las condiciones de diagnóstico internacionalmente aceptadas. Si esto se suma a estudios de genotipificación de los ovinos, podría convertirse en la mayor herramienta disponible para prevenir y controlar la enfermedad, en el caso que ésta se presente en el país, además de permitir una rápida actuación frente a la posibilidad cierta de transmisión hacia el humano y de nuevas cepas emergentes que pudieran aparecer del scrapie.

Este estudio hace posible recomendar la implementación de la IHQ, para la detección del scrapie en las etapas preclínica, lo que permitiría establecer programas de vigilancia y control más efectivos para la enfermedad.

De acuerdo a los objetivos planteados para la realización de este trabajo, los resultados obtenidos y la discusión originada de éstos, es que se plantean las siguientes conclusiones.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1.- Sesenta y siete de las 86 muestras nacionales de tercer párpado (77,9%) fueron considerados aptas para el diagnóstico inmunohistoquímico (IHQ) del scrapie, ya que presentaron 4 o más folículos linfoides con centro germinal en cada corte histológico.

2.- Ciento setenta de las 500 secciones de mucosa rectal correspondientes a 76 de los 100 ovinos nacionales estudiados (76%) fueron aptas para el diagnóstico IHQ del scrapie.

3.- El estudio estadístico demostró que la mejor área para tomar una biopsia *in vivo* de la mucosa rectal y obtener el tejido linfoide necesario para el diagnóstico IHQ de scrapie, es la comprendida entre 0,5 y 1,0 cm craneales a la unión mucocutánea.

4.- Todas las muestras ciegas de validación, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, que fueron positivas correspondían a animales cuyos óbex también fueron positivos, y todas las muestras de validación que fueron negativas correspondían a animales cuyos óbex fueron también negativos, lo que demuestra una elevada especificidad y sensibilidad de la técnica IHQ como medio de diagnóstico del scrapie.

5.- Todas las muestras aptas de los tejidos linfoides provenientes de los ovinos nacionales analizadas por IHQ resultaron negativas a scrapie clásico, puesto que no se observó el precipitado granular rojo, indicativo de inmunotinción en los folículos linfoides. En cambio, éste sí se observó en todos los controles positivos de óbex.

6.- La técnica IHQ realizada en el tejido linfoide, tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal de ovinos *in vivo*, es una herramienta potencialmente útil para el diagnóstico preclínico del scrapie, debido a que es un método práctico,

de fácil acceso y posible de realizar con un mínimo malestar para el animal, lo que hace posible una rápida toma de muestras en animales vivos.

7.- Es posible incluir los protocolos de IHQ utilizando muestras de tejido linfoide de tercer párpado y mucosa rectal, en los programas de vigilancia o de estrategias de control como una prueba de *screening*, por su alta especificidad y sensibilidad diagnóstica, para ser utilizada *in vivo* en la masa ovina.

8.- Este estudio hizo posible implementar, aplicar y validar este método (IHQ), para la detección del scrapie clásico en la etapa preclínica y contribuir con esto a los programas de vigilancia y control de la enfermedad, en regiones como la estudiada con baja probabilidad de encontrar animales enfermos.

7.- RESUMEN

7.- RESUMEN

El scrapie clásico producido por priones, es una enfermedad neurodegenerativa fatal que afecta a ovinos y caprinos, caracterizada por presentar un largo periodo de incubación, posterior a lo cual es posible el diagnóstico con la aparición gradual de los signos clínicos y las alteraciones neurológicas. La principal vía de transmisión entre los animales es la oral.

En Chile el scrapie no ha sido descrito, por tanto, al tratarse de una región con baja probabilidad de encontrar animales enfermos, los sistemas de vigilancia para esta enfermedad son de tipo pasivo, acotándose al muestreo *post mortem* de cierto número de animales, principalmente los que muestran sintomatología clínica compatible. Para esto se cuenta con herramientas diagnósticas como son la histopatológica tradicional y la inmunohistoquímica (IHQ). El gran inconveniente es que se utilizan muestras de cerebro, por lo que éstas deben ser obtenidas *post mortem*. Este hecho impide detectar la enfermedad en animales que pueden estar incubándola sin presentar la sintomatología, impidiendo así su manejo adecuado.

En este trabajo se analizó, implementó, aplicó y validó un método para detectar scrapie clásico en su etapa preclínica, utilizando la IHQ en muestras de tejido linfóide, tanto del tercer párpado como de la mucosa rectal de ovinos. De acuerdo con lo descrito, esta técnica permitiría realizar el diagnóstico en la fase preclínica de la enfermedad en poblaciones ovinas amplias, permitiendo realizar el diagnóstico en animales vivos y desarrollar estudios conducentes a establecer un estado comprobable del scrapie en la masa ovina nacional.

Por una parte, se obtuvieron y procesaron 86 muestras de tercer párpado de ovinos nacionales, 44 obtenidos de mataderos y 42 procedentes de animales con sintomatología nerviosa compatible con scrapie. Por otra parte, se analizaron 100 muestras de mucosa rectal distal de ovinos de mataderos, todos ellos entre los 2 a 4 años de edad. Además se utilizaron muestras ciegas de validación, 14 de tercer párpado y 12 de mucosa rectal, con sus respectivos

óbex. Como controles positivos y negativos se utilizaron un total de 37 muestras de óbex de ovinos, todas ellas fueron aportadas por un centro de referencia (CR).

Cada segmento de recto se cortó a distintas distancias a partir de la línea recto-anal (entre los 0,5 y 2,5 cms), con el propósito de definir la zona óptima para realizar una biopsia *in vivo*, que de acuerdo a nuestros resultados estaría comprendida entre los 0,5 a 1 cm. Todas las muestras obtenidas, fueron primero evaluadas en cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina y clasificadas como aptas cuando presentaban al menos 4 folículos linfoides en el corte analizado. Sobre esta base, 67 de las 86 muestras nacionales de tercer párpado y 170 de las 500 secciones de mucosa rectal, fueron considerados como aptas, estas últimas correspondieron a 76 de los 100 ovinos nacionales estudiados.

El análisis de los resultados de IHQ, indica que todas las muestras aptas nacionales fueron negativas a scrapie y que sólo 7 de las de tercer párpado y 6 de la mucosa rectal de las muestras ciegas de validación y sus respectivos óbex del CR fueron positivas. Además, en todos los controles positivos de óbex se observó inmunomarcaje de PrP^{Sc}, lo cual no se evidenció en los controles negativos.

La detección correcta de los controles positivos y negativos, además de los resultados descritos por este estudio, permiten demostrar y comprobar la aplicabilidad y capacidad para utilizar esta herramienta diagnóstica para el scrapie clásico en el tejido linfoide, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal de ovinos, en las condiciones del laboratorio de referencia del país. Esta técnica diagnóstica, junto con otros métodos diagnósticos, podrían ser aplicadas a la población ovina de regiones con baja probabilidad de encontrar enfermos de scrapie, lo que permitiría establecer la condición de país libre de scrapie clásico y obtener así los beneficios de este estado sanitario.

Palabras claves: scrapie, prión, EETs, IHQ.

8.- SUMMARY

8.- SUMMARY

The classical scrapie produced by prion is a fatal neurodegenerative disease that affects sheep and goats, characterized by a long incubation period, after which the diagnosis is possible with the gradual onset of clinical signs and neurological disorders. The main route of transmission between animals is oral.

In Chile scrapie has not been described, therefore, being a region with low probability of finding sick animals. Surveillance programs for this disease are passive using postmortem sampling of a number of animals, mainly those showing clinical signs compatible with the disease. The main diagnostic tools are traditional histopathological and immunohistochemistry (IHC). The big drawback is that brain samples are used, so they must be obtained post mortem, which does not allow to detect the disease in live animals that may be incubating the disease and that do not show clinical signs, and their proper handling.

In the present work we analyzed, implemented, applied and validated a method for detecting classical scrapie in the preclinical stage, using IHC in lymphoid tissue samples from both the third eyelid and the rectal mucosa of sheep. According to the description, this technique would make the diagnosis in the preclinical phase of the disease in large sheep populations, allowing the diagnosis in live animals and conduct studies to establish a state conducive verifiable sheep scrapie in the National sheep population.

In a first step, were obtained and processed 86 samples from domestic sheep third eyelid, 44 and 42 obtained from slaughterhouses and from animals with nervous signs compatible with scrapie. Moreover, 100 samples from distal rectal mucosa of sheep slaughterhouses, all of them 2 to 4 year-old were analyzed. Furthermore 14 blind samples from third eyelid and 12 from rectal mucosa, with their respective obex were used for validation purposes. 37 samples from sheep obex provided by a Reference Centre (RC) were used as positive and negative controls for the IHC.

Each rectal mucosa segment was cut at different distances from the recto-anal line (between 0.5 and 2.5 cm), with the purpose of defining the optimum site for biopsy in vivo, that according to the results of the present work was from 0.5 to 1 cm. All samples were first evaluated in sections stained with hematoxylin-eosin and classified as eligible when they had at least 4 lymphoid follicles with germinal centre per slide. On this basis, 67 of the 86 national samples from the third eyelid and 170 of 500 sections of the rectal mucosa, were considered as suitable, the latter corresponded to 76 of 100 domestic sheep studied.

The analysis of the results of IHC revealed that all national suitable samples were negative to scrapie and only 7 of the third eyelid and 6 of the rectal mucosa blind samples and their respective validation RC obex were positive. Furthermore, in all positive controls obex PrPSc immunolabelling was observed, which was not evident in the negative controls.

The correct detection of positive and negative controls as well as the results described in this study demonstrate and verify the applicability and ability to use this tool to diagnose classical scrapie in lymphoid tissue, both of third eyelid and rectal mucosa of sheep, under the conditions of the reference laboratory in the country. This diagnostic technique, along with other diagnostic methods, could be applied to the sheep population of regions with low probability of finding scrapie, which would allow to confirm the free status of classical scrapie and to obtain the benefits of this health condition.

Key words: scrapie, prion, TSEs, IHQ.

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aguzzi, A.; Heikenwalder, M.; Miele, G.** 2004. Progress and problems in the biology, diagnostic, and therapeutics of prion diseases. *J. Clin. Invest.* 114(2): 153-160.
2. **Aguzzi, A.; Polymenidou, M.** 2004. Mammalian prion biology: One century of evolving concepts. *Cell.* 116: 313-327.
3. **Aguzzi, A.** 2006. Prion diseases of humans and farm animals: epidemiology, genetics, and pathogenesis. *J. Neurochem.* 97: 1726-1739.
4. **Aguzzi, A.; Sigurdson, C.; Heikenwaelder, M.** 2008. Molecular mechanisms of prion pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3: 11-40.
5. **Almberg, E.; Cross, P.; Johnson, C.; Heisey, D.; Richard, B.** 2011. Modeling routes of chronic wasting disease transmission, environmental prion persistence promotes deer population decline and extinction. *Plos One* 6(5): 19896-19904.
6. **Andréoletti, O.; Berthon, P.; Marc, D.; Sarradin, P.; Grosclaude, J.; van Keulen, L.; Schelcher, F.; Elsen, J.; Lantier, F.** 2000. Early accumulation of PrP^{Sc} in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol.* 81(12): 3115-3126.
7. **Andréoletti, O.; Lacroux, C.; Chabert, A.; Monnereau, L. ; Tabouret, G. ; Lantier, F. ; Berthon, P. ; Eychenne, F. ; Lafond-Benestad, S. ; Elsen, J. ; Schelcher, F.** 2002. PrP^{Sc} accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J. Gen. Virol.* 83: 2607-2616.
8. **Andrews, N.; Farrington, C.; Ward, H.; Cousens, S.; Smith, P.; Molesworth, A.; Knight, R.; Ironside, J.; Will, R.** 2003. Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 361: 751-752.
9. **Andrievskaia, O.; Algire, J.; Balachandran, A; Nielsen, K.** 2008. Prion protein in sheep urine. *J. Vet. Diag. Invest.* 20(2): 141-146.
10. **Barash, JA.** 2009. Clinical features of sporadic fatal insomnia. *Rev. Neurol. Dis.* 6(3): E87-93.

11. **Baron, T.; Bencsik, A.; Morignat, E. 2010.** Prions of ruminants show distinct splenotropisms in an ovine transgenic mouse model. *PLoS ONE* 5(4): e10310-e10316.
12. **Baylis, M.; McIntyre, K. 2004.** Scrapie control under new strain. *Nature*. 432 (7019): 810-811.
13. **Beekes, M.; McBride, A. 2007.** The spread of prion through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS. J.* 274(3): 588-605.
14. **Belay, E.; Maddox, R.; Williams, E.; Miller, M.; Gambetti, P.; Schonberger, L. 2004.** Chronic wasting disease and potential transmission to humans. *Emerg. Infect. Dis.* 10 (6): 977-984.
15. **Bellworthy, S.; Hawkins, S.; Green, R.; Blamire, I.; Dexter, G.; Dexter, I.; Lockey, R.; Jeffrey, M.; Ryder, S.; Berthelin-Baker, C.; Simmons, M. 2005.** Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenger. *Vet. Rec.* 156: 197-202.
16. **Bencsik, A.; Debeer, S.; Petit, T.; Baron, T. 2009.** Possible case of maternal transmission of feline spongiform encephalopathy in a captive cheetah. *PloS One* 4(9): e6929-e6935.
17. **Benestad, S.; Arsac, J.; Goldmann, W.; Nöremark, M. 2008.** Atypical/ Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet. Res.* 39(4): 19-32.
18. **Beringue, V.; Vilotte, J.; Laude, H. 2008.** Prion agent diversity and species barrier. *Vet. Res.* 39(4): 47-53.
19. **Bermejo, F.; Muñoz, D. 2001.** Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSEs) o enfermedades producidas por priones. *Rev. Adm. San.* 17: 27-44.
20. **Bishop, M.; Will, R.; Manson, J. 2010.** Defining sporadic Creutzfeldt-Jakob disease strains and their transmission properties. *PNAS* 107(32): 14402-14406.
21. **Boenisch, T. 2001.** Basic Enzymology. En: *Immunochemical staining methods*. 3a ed. USA. DakoCytomation. pp. 14-17.
22. **Bozzeta, E.; Acutis, P.; Martucci, F.; Nappi, R.; Casalone, C.; Mazza, M.; Caramelli, M. 2004.** Evaluation of rapid test for the diagnosis of

- transmissible spongiform encephalopathies in sheep and goats. *Acta Neuropathol.* 107: 559 – 562.
23. **Bradley, R.** 2002. Bovine spongiform encephalopathy Update. *Acta Neurobiol. Exp.* 62(3): 183-195.
 24. **Brown, P.; Will, R.; Bradley, R.; Asher, D.; Detwiler, L.** 2001. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob Disease: Background, evolutions, and current concerns. *Emerg. Infect. Dis.* 7: 6-16.
 25. **Brown, K.; Mastrianni, J.** 2010. The prion diseases. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 23(4): 277-298.
 26. **Brun, A.; Castilla, J.; Rodríguez, F.; Torres, J.** 2003. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiformes transmisibles. *Rev. Neurol.* 37: 648-653.
 27. **Buchanan, T.** 2012. Ontario Chronic Wasting Disease Surveillance Program. 2011 Progress Report. Wildlife Research and Development Section Ministry of Natural Resources. On line: <http://www.mnr.gov.on.ca/stdprodconsume/groups/lr/@mnr/@fw/document/s/document/stdprod_094936.pdf> 7 pp.
 28. **Caplazi, P.; O'Rourke, K.; Wolf, C.; Shaw, D.; Baszler, T.** 2004. Biology of PrP^{Sc} accumulation in two natural scrapie - infected sheep flocks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 489 – 496.
 29. **Capellari, S.; Strammiello, R.; Saverioni, D.; Kretzschmar, H.; Parchi, P.** 2011. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol.* 121(1): 21-37.
 30. **Caramelli, M.; Ru, G.; Acutis, P.; Gianluigi, F.** 2006. Prion diseases: Current understanding of epidemiology and pathogenesis, and therapeutic advances. *CNS Drugs.* 20(1): 15-28.
 31. **Casalone, C.; Corona, C.; Crescio, M.; Martucci, F.; Mazza, M.; Ru, G.; Bozzeta, E.; Acutis, P.; Caramelli, M.** 2005. Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. *J. Virol.* 79: 5847-5849.

32. **Castilla, J.; Brun, A.; Gutierrez-Adan, A.; Pintado, B.; Torres, J.** 2002. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en especies ganaderas y silvestres. *Invest. Agr. Prod. Sanid. Anim.* 17: 1-15.
33. **Castilla, J.; Saá, P.; Hetz, C.; Soto C.** 2005. *In vitro* generation of infectious Scrapie prions. *Cell* 121: 195-206.
34. **CDC. (Centers for Diseases Control and preventions).** 1996. News and Notes: BSE meeting at Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). *Emerg. Infec. Dis.* 2: pp. 157.
35. **CE. (Comisión Europea).** 2010. Segunda hoja de ruta contra las EET. Documento sobre la estrategia 2010-2015 contra las encefalopatías espongiformes transmisibles. Bruselas,16.7.2010 COM384 final. On line: <ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/roadmap_2_es.pdf> (Consulta: 04-junio-2012) 36 pp.
36. **Chesebro, B.** 2003. Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66(1): 1-20.
37. **Colchester, A.; Colchester, N.** 2005. The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet* 366(9488): 856-861.
38. **Collinge, J.; Sidle, K.; Meads, J.; Ironside, J.; Hill, A.** 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the etiology of "new variant" CJD. *Nature* 383: 685-690.
39. **Collinge, J.** 2001. Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.* 24(1): 519-550.
40. **Collinge, J.** 2005. Molecular neurology of prion disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 76(7): 906-919.
41. **Collins, S.; Lawson, V.; Masters, C.** 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363: 51-61.
42. **CRL. (European Community Reference Laboratory for Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE)).** 2004. Clinicals signs of bovine spongiform encephalopathy in cattle. [On line]: <<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/documents/science-bse-res.pdf>> [consulta: 24-08-10]. 11 pp.

43. **CRL. (European Community Reference Laboratory for Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE)).** 2007. Clinicals signs of scrapie in sheep. [On line]: <<http://www.defra.gov.uk/corporate/vla/science/documents/science-scrapie-res.pdf>> [consulta: 07-05-11].
44. **Crozet, C.; Beranger, F.; Lehmann, S.** 2008. Cellular pathogenesis in prion disease. *Vet. Res.* 39(4): 1-14.
45. **Davies, M.; Hopkins, L.; Halliday, S.; Houston, F.; Hunter, N.; M^cConnell, I.** 2004. Architecture of secondary lymphoid tissue in sheep experimentally challenged with Scrapie. *Immunology* 111: 230-236.
46. **Dearmond, S.; Prusiner, S.** 1995. Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am. J. Pathol.* 146: 785-804.
47. **Debeer, S.; Baron, R.; Bencsik, A.** 2002. Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrPsc immunohistochemistry of fixed but previously frozen brain samples *J. Histochem. Cytochem.* 50(5): 611-616.
48. **DEFRA. (Departament for Environment Food and Rural Affairs).** 2004. Scrapie-Advisory notes for farmers. 20 pp.
49. **DEFRA. (Departament for Environment Food and Rural Affairs).** 2008. Animal health and welfare. BSE: Others TSEs- Scrapie. Clinical signs. [On line]. [consulta: 09-05-2011].
<<http://www.defra.gov.uk/animalh/bse/othertses/scrapie/index.html>> 3pp.
50. **Delgado-Hachmeister, J.; Rangel-Frausto, M.; Ponce de León, S.** 2002. Encefalopatías espongiformes transmisibles. *Salud Pública México.* 44(1): 69-75.
51. **Detwiler, L.; Baylis, M.** 2003. The epidemiology of scrapie. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. (OIE)* 22(1): 121-143.
52. **Doherr, M.** 2007. Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE). *Vaccine.* 25(30): 5619-5624.
53. **Dormont, D.** 2002. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett.* 529(1): 17-21.
54. **Dubé, C.; Mehren, K.; Barker, I.; Peart, B.; Balachandran, A.** 2006. Retrospective investigation of chronic wasting disease of cervids at the Toronto Zoo, 1973-2003. *Can. Vet. J.* 47(12): 1185-1193.

55. **Dudas, S.; Yang, J.; Graham, C.; Czub, M.; McAllister, T.; Coulthart, M.; Czub, S.** 2010. Molecular, Biochemical and genetic characteristics of BSE in Canada. *Plos One* 5(5): 10638-10646.
56. **Ducrot, C.; Arnold, M.; DE Koeijer, A.; Heim, D.; Calavas, D.** 2008. Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemias. *Vet. Res.* 39: 15-23.
57. **Dustan, B.; Spencer, Y.; Casalone, C.; Brownlie, J.; Simmons, M.** 2008. A histopathologic and immunohistochemical review of archived UK caprine scrapie cases. *Vet. Pathol.* 45(4): 443-454.
58. **Eiden, M.; Hoffmann, C.; Balkema, A.; Muller, M.; Baumgartner, K.; Groschup, M.** 2010. Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *J. Gen. Virol.* 91: 2874-2883.
59. **Ersdal, C.; Ulvund, M.; Espenes, A.; Benestad, S.; Sarradin, P.; Landsverk, T.** 2005. Mapping PrP^{Sc} propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet. Pathol.* 42(3): 258-274.
60. **Espenes, A.; Press, C.; Landsverk, T.; Tranulis, M.; Aleksandersen, M.; Gunnes, G.; Benestad, S.; Fuglesteit, R.; Ulvund, M.** 2006. Detection of PrP^{Sc} in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J. Comp. Path.* 134: 115-125.
61. **Everest, S.; Ramsay, A.; Chaplin, M.; Everitt, S.; Stack, M.; Neale, M.; Jeffrey, M.; Moore, S.; Bellworthy, S.; Terry, L.** 2011. Detection and localization of PrP^{Sc} in the liver of sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One* 6(5): e19737-e19742.
62. **FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2003. Manual técnico para el reconocimiento de la EEB. 81 pp.
63. **FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2007. Encefalopatías Espongiformes Transmibles. Encefalopatía Espongiforme Bovina. [On line]. [consulta: 20-06-10]. 21pp.
- <http://www.fao.org/regional/america/prior/segalim/animal/eeb/eet/enfani.htm>
64. **FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations).** 2009. Encefalopatías Espongiformes Transmibles. Zoonosis. [On line]. [consulta: 20-03-11]. 10pp. < <http://www.zoonosis.unam.mx/index.php?option=com> >

65. **Farías, G.; Núñez, P.; Padilla, D.; Goicoechea, J.** 2004. Patologías producidas por priones. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 1(1): 1-16.
66. **Farías, G.; Saavedra, S. Nuñez, P.; Padilla, D.; Mathieu, C.; Lecocq, C.** 2005. Detección de Encefalopatía Espongiforme Bovina mediante Inmunotransferencia. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 2(2): 112-120.
67. **Farías, G.; Machuca, A.; Bravo, C.; Madariaga, M.; Jara, C.; Lecocq, C.** 2009. Utilización de inmunoreacciones para detección de scrapie en óbex de ovinos provenientes de la XII Región de Chile. *Av. Cs. Vet.* 24(1): 49-55.
68. **Farías, G.; Garcés, H.; Larenas, J.; Ramírez, AM.; Lecocq, C.** 2011. Principales enfermedades producidas por priones en los animales. *Av. Cs. Vet.* 26 (1): 1-10.
69. **Fediaevsky, A.; Tongue, S.; Nöremark, M.; Calavas, D.; Ru, G.; Hopp, P.** 2008. A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet. Res.* 4(19): 1186-1210.
70. **Fink, S.** 1987. Some new methods for affixing sections to glass slides. I. Aqueous adhesives. *Stain Technol.* 62(1): 27-33.
71. **Fournier, J.; Grigoriev, V.** 2001. Prion diseases: contribution of high-resolution immunomorphology. *J. Cell. Mol. Med.* 5(4): 367 – 377.
72. **Gama, L.; Carolino, M.; Santos-Silva, M.; Pimenta, J.; Costa, M.** 2006. Prion protein genetic polymorphisms and breeding strategies in Portuguese breeds of sheep. *Livest. Sci.* 99(2-3): 175-184.
73. **Gambetti, P.; Kong, Q.; Zou, W.; Parchi, P.; Chen, S.** 2003. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br. Med. Bull.* 66(1): 213-239.
74. **Gavier-Widén, D.; Stack, M.; Baron, T.; Balachandran, A.; Simmons, M.** 2005. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17(6): 509-527.
75. **Gilch, S.; Chitoor, N.; Taguchi, Y.; Stuart, M.; Jewell, J.; Schatzl, H.** 2011. Chronic wasting disease. *Top. Curr. Chem.* 305: 51-77.
76. **Glatzel, M.; Aguzzi, A.** 2001. The shifting biology of prions. *Brain Res. Rev.* 36: 241-248.

77. **González, L.** 2002. Consideraciones acerca del diagnóstico y control del Scrapie. **In:** Ponencia en XXVII Jornadas Científicas de la S.E.O.C. Valencia., España. pp: 79-91.
78. **González, L.; Daleish, M. P.; Bellworthy, S. J.; Sisó, S.; Stack, M. J.; Chaplin, M. J.; Davis, L. A.; Hawkins, S. A. C.; Hughes, J.; Jeffrey, M.** 2006. Postmortem diagnosis of preclinical and clinical Scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet. Rec.* 158: 325-331.
79. **González, L.; Dagleish, M.; Martin, S.; Dexter, G.; Steele, P.; Finlayson, J.; Jeffrey, M.** 2008. Diagnosis of preclinical Scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination rectal biopsias. *Vet. Rec.* 162(13): 397-403.
80. **Gossner, A.; Hunter, N.; Hopkins, J.** 2006. Role of lymph-borne cells in the early stages of scrapie agent dissemination from the skin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 109(3-4): 267-278.
81. **Grassi, J.; Maillet, S.; Simon, S.; Morel, N.** 2008. Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet. Res.* 39(4): 33-40.
82. **Hamir, A.; Miller, J.; Schmerr, M.; Stack, M.; Chaplin, J.; Cutlip, R.** 2001. Brief communications: Diagnosis of preclinical and subclinical Scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available post-mortem diagnostic techniques. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13: 152-154.
83. **Hamir, A.; Miller, J.; Cutlip, R.** 2004. Failure to detect prion protein (PrPres) by immunohistochemistry in striated muscle tissues of animals experimentally inoculated with agents of transmissible spongiform encephalopathy. *Vet. Pathol.* 41(1): 78-81.
84. **Harrington, R.; Baszler, T.; O'Rourke, K.; Schneider, D.; Spraker, T.; Liggitt, H.; Knowles D.** 2008. A species barrier limits transmission of chronic wasting disease to mink (*Mustela vison*). *J. Gen. Virol.* 89(4): 1086-1096.
85. **Heggebø, R.; González, L.; Press, C.; Gunnes, G.; Espenes, A.; Jeffrey, M.** 2003. Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J. Gen. Virol.* 84(5): 1327-1338.

86. **Heaton, M.; Leymaster, K.; Kalbfleisch, T.; Freking, B.; Smith, T.; Clawson, M.; Laegreid, W.** 2010. Ovine reference materials and assays for prion genetic testing. *BMC Vet. Res.* 6: 23-30.
87. **Hilbe, M.; Soldati, G.; Zlinszky, K.; Wunderlin, S.; Ehrensperger, F.** 2009. Immunohistochemical study of PrP(Sc) distribution in neural and extraneural tissues of two cats with feline spongiform encephalopathy. *BMC Vet. Res.* 5: 11-17.
88. **Hu, W.; Kieseier, B.; Fronhman, E.; Eagar, T.; Rosenberg, R.; Hartung, H.; Stuve, O.** 2008. Prion proteins: physiological functions and role in neurological disorders. *J. Neurol. Sci.* 264(1-2): 1-8.
89. **Hunter, N.** 2003. Scrapie and experimental BSE in sheep. *Br. Med. Bull.* 66 (1): 171-183.
90. **Hunter, N.** 2007. Scrapie Uncertainties, biology and molecular approaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1772: 619-628.
91. **Hur, K.; Kim, J.; Choi, S.; Choi, E.; Carp, R.; Kim, Y.** 2002. The pathogenic mechanisms of prion diseases. *Mech. Ageing. Dev.* 123(12): 1637-1647.
92. **Imran, M.; Mahmood, S.** 2011. An overview of animal prion diseases. *Virology* 438: 493-502.
93. **Iulini, B.; Cantile, C.; Mandara, M.; Maurella, C.; Loria, G.; Castagnaro M.; Salvadori, C.; Porcario, C.; Corona C.; Perazzini, A.; Maroni, A.; Caramelli, M.; Casalone, C.** 2008. Neuropathology of Italian cats in feline spongiform encephalopathy surveillance. *Vet. Pathol.* 45(5): 626-33.
94. **Jacobson, K.; Lee, S.; Somerville, R.; McKenzie, D.; Benson, C.; Pedersen, J.** 2010. Transport of the pathogenic prion protein through soils. *J. Environ Qual.* 39(4): 1145-1152.
95. **Jeffrey, M.; González, L.** 2007. Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies, pathogenesis, pathological phenotypes and clinical diseases. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33: 373-394.
96. **Johnson, R.** 2005. Prion Diseases. *Lancet* 4: 635-642.
97. **Johnson, M.; Evoniuk, J.; Stoltenow, C.; O'Rourke, K.; Redmer, D.** 2007. Development of an assay to determine single nucleotide

- polymorphisms in the prion gene for the genetic diagnosis of relative susceptibility to classical scrapie in sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19: 73-77.
98. **Khan, M.; Sweeting, B.; Mulligan, V.; Arslan, P.; Cashman, N.; Pai, E.; Chakrabartty, A.** 2010. Prion disease susceptibility is affected by B-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP. *PNAS.* 107(46): 19808-19813.
99. **Kong, Q.; Huang, S.; Zou, W.; Vanegas, D.; Wang, M.; Wu, D.; Yuan, J.; Zheng, M.; Bai, H.; Deng, H.; Chen, K.; Jenny, A.; O'Rourke, K.; Belay, E.; Schonberger, L.; Petersen, R.; Sy, M.; Chen, S.; Gambetti, P.** 2005. Chronic Wasting Disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models. *J. Neurosci.* 25(35): 7944-7949.
100. **Konold, T.; Sivam, S.; Ryan, J.; Gubbins, S.; Laven, R.; Howe, M.** 2006. Analysis of clinical signs associated with bovine spongiform encephalopathy in casualty slaughter cattle. *Vet. J.* 171: 438-444.
101. **Konold, T.; Sayers, A.; Sach, A.; Bone, G.; van Winden, S.; Wells, G.; Simmons, M.; Stack, M.; Wear, A.; Hawkins, S.** 2010a. Relationship between clinical signs and postmortem test status in cattle experimentally infected with the bovine spongiform encephalopathy agent. *BMC. Vet. Res.* 6: 53-60.
102. **Konold, T.; Bone, G.; Phelan, L.; Simmons, M.; González, L.; Sisó, S.; Goldmann, W.; Cawthraw, S.; Hawkins, S.** 2010b. Monitoring of clinical signs in goats with transmissible spongiform encephalopathies. *BMC. Vet. Res.* 6: 13-28
103. **Kratzel, C.; Krüger, D.; Beekes, M.** 2007. Relevance of the regional Lymph node in scrapie pathogenesis after peripheral infection of hamsters. *BMC Vet. Res.* 3: 22-30.
104. **Krumm, C.; Conner, M.; Hobbs, N.; Hunter, D., Miller, M.** 2010. Mountain lions prey selectively on prion-infected mule deer. *Biol. Lett.* 6(2): 209-211.
105. **Kübler, E.; Oesch, B.; Raeber, A.** 2003. Diagnosis of prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66 (1): 267-279.
106. **Kunkle, R.; Miller, J.; Alt, D.; Cutlip, R.; Cockett, N.; Wang S.; Richt, J.; Thomsen, B.; Hall, S.** 2006. Determination of sheep prion gene

- polymorphisms from paraffin-embedded tissue. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18: 443-447.
107. **Lasmézas, C.I.** 2003. The trasmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22 (1): 23-26.
 108. **Lezmi, S.; Bencsik, A.; Monks, E.; Petit, T.; Baron, T.** 2003. First case of Feline Spongiform Encephalopathy in a captive cheetah born in France: PrPSc in various tissues revealed unexpected targeting of kidney and adrenal gland. *Histochem. Cell. Biol.* 119: 415-422.
 109. **Lezmi, S.; Baron, T.; Bencsik, A.** 2010. Is the presence of abnormal prion protein in renal glomeruli of feline species presenting with FSE authentic. *BMC Vet. Res.* 6: 41-47.
 110. **Liberski, P.; Sikorska, B.; Guiroy, D.; Bessen, R.** 2009. Transmissible mink encephalopathy - review of the etiology of a rare prion disease. *Folia Neuropathol.* 47(2): 195-204.
 111. **Liberski, P.; Sikorska, B.; Hauw, J.; Kopp, N.; Streichenberger, N.; Giraud, P.; Boellaard, J.; Budka, H.; Kovacs, G.; Ironside, J.; Brown, P.** 2010. Ultrastructural characteristics (or evaluation) of Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Ultrastruct Pathol.*34(6): 351-61.
 112. **Loiacono, C.; Thomsen, B.; Hall, S.; Kiupel, M.; Sutton, D.; O'Rourke, K.; Barr, B.; Anthenill, L.; Keane, D.** 2009. Nor98 scrapie indentified in the United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21(4): 454-463.
 113. **Loiacono, C.; Beckwith, N.; Kunkle, R.; Orcutt, D.; Hall, S.** 2010. Detection of PrP(Sc) in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by Western blot differentiates classical scrapie, Nor98 scrapie, and bovine spongiform encephalopathy. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22(5): 684-689.
 114. **Lysek, D. A.; Schorn, C.; Nivon, L. G.; Esteve-Moya, V.; Christen, B.; Calzolari, L.; von Schroetter, C.; Fiorito, F.; Herrmann, T.; Güntert, P.; Wüthrich, K.** 2004. Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs and sheep. *PNAS.* 102 (3): 640-645.
 115. **Mabbott, N.; Brown, K.; Manson, J.; Bruce, M.** 1997. T-lymphocyte activation and the cellular form of the prion protein. *Immunology* 92: 161-165.

116. **Mabbot, N.; Bruce, M.** 2001. The immunobiology of the TSE diseases. *J. Gen. Virol.* 82: 2307-2318.
117. **Machuca, A.; Lecocq, C.; Jara, C.; Farías, G.** 2006. Detección de proteína priónica patológica ovina mediante inmunohistoquímica en animales provenientes de la XII Región. *Mon. Electr. Patol. Vet.* 3(2): 66-81.
118. **Mackay, G.; Knight, R.; Ironside, J.** 2011. The molecular epidemiology of variant CJD. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2(3): 217-27.
119. **Maddison, BC.; Baker, CA.; Rees, HC.; Terry, LA.; Thorne, L.; Bellworthy, SJ.; Whitelam, GC.; Gough, KC.** 2009. Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J. Virol.* 83(16): 8293-8296.
120. **Maddison, BC.; Rees, HC.; Baker, CA.; Taema, M.; Bellworthy, SJ.; Thorne, L.; Terry, LA.; Gough, KC.** 2010. Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J. Infect. Dis.* 201(11): 1672-1676.
121. **Manuelidis, L.; Chakrabarty, T.; Miyazawa, K.; Nduom, N.; Emmerling, K.** 2009. The kuru infectious agent is a unique geographic isolate distinct from Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106(32): 13529-13534.
122. **Maurer, E.; Botteron, C.; Ehrensperger, F.; Fatzer, R.; Jaggy, A.; Kolly, C.; Meylan, M.; Zurbriggen, A.; Doherr, M.** 2005. Swiss scrapie surveillance. I. Clinical aspects of neurological diseases in sheep and goats. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 147(10): 425-433.
123. **McGovern, G.; Jeffrey, M.** 2007. Scrapie-specific pathology of sheep lymphoid tissues. *PLoS ONE.* 2(12): 1304-1310.
124. **Miller, M.; Williams, E.** 2002. Detection of PrP^{CWD} in mule deer by immunohistochemistry of lymphoid tissues. *Vet. Rec.* 151: 610-612.
125. **Miller, M.; Williams, E.** 2004. Chronic wasting disease of cervids. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 284(1): 193-214.
126. **Mitchell, G.; O'Rourke, K.; Harrington, N.; Soutyrine, A.; Simmons, M.; Dudas, S.; Zhuang, D.; Laude, H.; Balachandran, A.** 2010. Identification of atypical scrapie in Canadian sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22 (3): 408-411.
127. **Monleón, E.; Monzón, M.; Hortells, P.; Bolea, R.; Acín, C.; Vargas, F.; Badiola, J.** 2004. Detection of PrP^{Sc} on lymphoid tissues from naturally

- affected scrapie animals: comparison of three visualization systems. *J. Histochem. Cytochem.* 52(2): 145-151.
128. **Monleón, E.; Monzón, M.; Hortells, P.; Bolea, R.; Acín, C.; Vargas, F.; Badiola, J.** 2005. Approaches to scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid test on central nervous and lymphoreticular systems. *J. Virol. Methods.* 125 (2): 165-171.
 129. **Monleón, E.; Garza M.; Sarasa, R.; Álvarez, j.; Bolea, R.; Monzón, M.; Vargas, A.; Badiola, J.; Acin, C.** 2011. An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Vet. Microbiol.* 147: 237-243.
 130. **Muñoz Serrano, A.** 2002. *Estadística Aplicada Uni y Multivariante*. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla (España). pp. 1019.
 131. **Noinville, S.; Chich, J-F.; Rezaei, H.** 2008. Misfolding of the prion protein: linking biophysical and biological approaches. *Vet. Res.* 39(48): 1-17.
 132. **Nonno, R.; Esposito, E.; Vaccari, G.; Conte, M.; Marcon, S.; Di Bari, M.; Ligios, C.; Di Guardo, G.; Agromi, U.** 2003. Molecular análisis of cases of italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. *J. Clin. Microb.* 41: 4127-4133.
 133. **Norrby, E.** 2011. Prions and protein-folding diseases. *J. Intern. Med.* 270(1): 1-14.
 134. **Novakofski, J.; Brewer, M.; Mateus-Pinilla, N.; Killefer, J.; McCusker, R.** 2005. Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J. Anim. Sci.* 83(6): 1455-1476.
 135. **OIE. (Organización Mundial de Sanidad Animal).** 2004. *Manual of diagnostic test and vaccines for Terrestrial Animals*. Vols. I and II, 5th Ed. 1178 pp.
 136. **OIE. (Organización Mundial de Sanidad Animal).** 2007. List of countries by sanitary situación. [On line]. http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=disease_status_lists [consulta: 24-11-2010].
 137. **OIE, (Organización Mundial de Sanidad Animal).** 2009. *Información Sanitaria Mundial*. Número de casos de Encefalopatía Espongiforme Bovina

- (EEB), en bovinos de cría, señalados en el mundo. [On line]. <http://www.oie.int/esp/info/es_esbmonde.htm> [consulta: 09-12-2009]. 3 pp.
138. **OIE, (Organización Mundial de la Sanidad Animal)**. 2010. Estatus de los miembros respecto de la encefalopatía espongiforme bovina. Estatus sanitario oficial. [On line]. <http://www.oie.int/esp/Status/BSE/es_BSE_free.htm#1> [consulta: 17-12-2010].
139. **OIE, (Organización Mundial de Sanidad Animal)**. 2012a. Distribución geográfica de los países que declararon casos confirmados de EEB desde 1989. [On line]. <<http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/datos-especificos-de-eeb/>>. (Consulta: 05-11-2012)
140. **OIE, (Organización Mundial de Sanidad Animal)**. 2012b. Mapas de distribución de enfermedades. Interfaz de la base de datos del sistema mundial de información zoonosológica (WAHID) Prurigo Lumbar. Segundo semestre 2012. [Online]. <http://web.oie.int/wahis/public.php?page=disease_statusap&disease_type=Terrestrial&disease_id=53&disease_category_terrestrial=2&empty=999999&disease_category_aquatic=&disease_serotype=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2011&selected_report_period=2&selected_start_month=1&page=disease_status_map&date_submit=OK> (consulta: 08-10-2012).
141. **O'Rourke, K.; Baszler, T.; Besser, T.; Miller, J.; Cutlip, R.; Wells, G.; Ryder, S.; Parish, S.; Hamir, A.; Cockett, N.; Jenny, A.; Knowles, D.** 2000. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin. Microbiol.* 38(9): 3254-3259.
142. **O'Rourke, K.; Duncan, J.; Logan, J.; Anderson, A.; Norden, D.; Williams, S.; Combs, B.; Stobart, R.; Moss, G.; Sutton, D.** 2002. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 9(5): 966-971.
143. **O'Rourke, K.; Zhuang, D.; Truscott, T.; Yan, H.; Schneider, D.** 2011. Sparse PrP^{Sc} accumulation in the placentas of goats with naturally acquired scrapie. *BMC. Vet. Res.* 7(7): 1746-1754.

144. **Orrú, C.; Wilham, J.; Raymond, L.; Kuhn, F.; Schroeder, B.; Raeber, A., Caughey, B. 2011.** Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion. *M. Bio.* 2(3): 78-91.
145. **Ortiz-Pelaez, A.; Bianchini, J. 2011.** The impact of the genotype on the prevalence of classical scrapie at population level. *Vet. Res.* 42: 31-39.
146. **Parveen, I.; Moorby, J.; Allison, G.; Jackman, R. 2005.** The use of non-prion biomarkers for the diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in the live animal. *Vet. Res.* 36(5): 665-683.
147. **Pirisinu, L.; Migliore, S.; Di Bari, M.; Esposito, E.; Baron, T.; D'Agostino, C.; De Grossi, L.; Vaccari, G.; Agrimi, U.; Nonno, R. 2011.** Molecular discrimination of sheep bovine spongiform encephalopathy from scrapie. *Emerg. Infec. Dis.* 17(4): 695-698.
148. **Prince, M.; Bailey, J.; Barrowman, P.; Bishop, K.; Campbell, G.; Wood, J. 2003.** Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22(1): 37-60.
149. **Prusiner, S. 1995.** The prion diseases. *Sci. Am.* 272(1): 48-56.
150. **Prusiner, S. 1998.** Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(23): 13363-13383.
151. **Romero-Trevejo, J.; Gómez-Villamandos, J.; Pedrera, M.; Blanco, A.; Bautista, M.; Sánchez-Cordón, P. 2010.** Immunohistochemical study of macrophage and cytokine dynamics in the gut of scrapie-infected mice. *Histol. Histopathol.* 25: 1025-1038.
152. **Ronga, L.; Tizzano, B.; Palladito, P.; Ragone, R.; Urso, E.; Mafia, M.; Ruvo, M.; Benedetti, E. y Rossi, F. 2006.** The prion protein: structural features and related toxic peptides. *Chem. Biol. Drug Des.* 68: 139-147.
153. **Ryou, C. 2007.** Prions and prion diseases: fundamentals and mechanistic details. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17(7): 1059-1070.
154. **Ryder, S.; Wells, G.; Bradshaw, J.; Pearson, G. 2001.** Inconsistent detection of PrP in extraneural tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 148(14): 437-441.
155. **SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero). 2005.** Instructivo técnico para la vigilancia de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), Chile. 54 pp.

156. **SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero).** 2007. Prevención de EEB. [On line]. <http://www.sag.gob.cl/portal/page?_pageid=133,2712741&_dad=portal&_schema=PORTAL>. [consulta: 26-11-2009].
157. **SAG. (Servicio Agrícola y Ganadero).** 2008. Prevención de EEB desde 1990. [On line]. <http://www.sag.gob.cl/portal/page?_pageid=133,2712756&_dad=portal&_schema=PORTAL> [consulta: 11-05-2010]. 4 pp.
158. **SAG (Servicio Agrícola y Ganadero).** 2010. Programa de vigilancia de enfermedades de animales. División de protección pecuaria subdepartamento de vigilancia epidemiológica. Servicio Agrícola y Ganadero. Chile. pp: 1-48.
159. **Sakudo, A.; Ikuta, K.** 2009. Prion protein functions and dysfunction in prion disease. *Curr. Med. Chem.* 16(3): 380-389.
160. **Sakudo, A.; Ano, Y.; Onodera, T.; Nitta, K.; Shintani, H., Ikuta, K.; Tanaka, Y.** 2011. Fundamentals of prions and their inactivation (Review). *Int. J. Mol. Med.* 4: 483-489.
161. **Salguero, F.; Díaz-San, S.; Brun, A.; Cano, M.; Torres, J.** 2006. Comparison of three monoclonal antibodies for use in immunohistochemical detection of bovine spongiform encephalopathy protease-resistant prion protein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 18(1): 106-109.
162. **Salvadori, C.; Lossi, L.; Arispici, M.; Cantile, C.** 2007. Spongiform neurodegenerative disease in a Persian kitten. *J. Feline Med. Surg.* 9(3): 242-245.
163. **Sandberg, M.; Al-Doujaily, H.; Sigurdson, C.; Glatzel, M.; O'Malley, C.; Powell, C.; Asante, E.; Linehan, J.; Brandner, S.; Wadsworth, J.; Collinge, J.** 2010. Chronic wasting disease prion are not transmissible to transgenic mice overexpressing human prion protein. *J. Gen. Virol.* 91(10): 2651-2657.
164. **Saunders, S.; Bartelt-Hunt, S.; Bartz, J.** 2012. Occurrence, Transmission, and Zoonotic Potential of Chronic Wasting Disease. *Emerg. Infect. Dis.* 18(3): 369-376.
165. **Sedgmen, B.; Lofthouse, S.; Scheerlinck, J-P.; Meeusen, E.** 2002. Cellular and molecular characterisation of the ovine rectal mucosal environment. *Vet. Immunol. immunopathol.* 86: 215-220.

166. **Seidel, B.; Thomzig, A.; Buschmann, A.; Groschup, M.; Peters, R.; Beekes, M.; Terytze, K.** 2007. Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS ONE*. 2(5): e435-e445.
167. **Seuberlich, T.; Botteron, C.; Benestad, S.; Brûnisholz, H.; Wyss, R.; Kihm, U.; Schwermer, H.; Friess, M.; Nicolier, A.; Heim, D.; Zurbriggen, A.** 2007. Atypical scrapie in a Swiss goat and implications for transmissible spongiform encephalopathy surveillance. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(1): 2-8.
168. **Sigurdson, C.; Miller, M.** 2003. Other animal prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66(1): 199-112.
169. **Sigurdson, C.** 2008. A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet. Res.* 39(4): 41-52.
170. **Sigurdson, C.; Peter, K.; Nilsson, R.; Hornemann, S.; Manco, G.; Fernández-Borges, N.; Schwarz, P.; Castilla, J.; Wüthrich, Aguzzi, A.** 2010. A molecular switch controls interspecies prion disease transmission in mice. *J. Clin. Invest.* 120(7): 2590-2599.
171. **Sikorska, B.; Liberski, P.; Sobów, T.; Budka, H.; Ironside, J.** 2009. Ultrastructural study of florid plaques in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a comparison with amyloid plaques in kuru, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35(1): 46-59.
172. **Simmons, M.; Spiropoulos, J.; Webb, P.; Spencer, Y.; Czub, S.; Mueller, R.; Davis, A.; Arnold, M.; Marsh, S.; Hawkins, S.; Cooper, J.; Konold, T.; Wells, G.** 2011. Experimental Classical Bovine Spongiform Encephalopathy: Definition and Progression of Neural PrP Immunolabeling in Relation to Diagnosis and Disease Controls. *Vet. Pathol.* 48(5): 948-963.
173. **Smith, P.; Bradley, K.** 2003. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *Br. Med. Bull.* 66: 185-198.
174. **Spraker, T.; O'rouke, K.; Balachandran, A.; Zink, R.; Cummings, B.; Miller, W.; Powers, B.** 2002. Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 3-7.

175. **Stack, M.; Balachandran, A.; Chaplin, M.; Davis, L.; Czub, S.; Miller, B.** 2004. The first Canadian indigenous case of bovine spongiform encephalopathy (BSE) has molecular characteristics for prion protein that are similar to those of BSE in the United Kingdom but differ from those of chronic wasting disease in captive elk and deer. *Can. Vet. J.* 45: 825-830.
176. **Stack, M.; Moore, S.; Davis, A.; Webb, P.; Bradshaw, J.; Lee, Y.; Chaplin, M.; Focosi-Snyman, R.; Thurston, L.; Spencer, Y.; Hawkins, S.; Arnold, M.; Simmons, M.; Wells, G.** 2011. Bovine spongiform encephalopathy: investigation of phenotypic variation among passive surveillance cases. *J. Comp. Pathol.* 144(4): 277-288.
177. **Sunkesula, S.; Luo, X.; Das, D.; Singh, A.; Singh, N.** 2010. Iron content of ferritin modulates its uptake by intestinal epithelium: implications for co-transport of prions. *Mol. Brain* 3: 14-19.
178. **Tattum, M.; Jones, S.; Pal, S.; Khalili-Shirazi, A.; Collinge, J.; Jackson, G.** 2010. A highly sensitive immunoassay for the detection of prion-infected material in whole human blood without the use of proteinase K. *Transfusion* 50: 2619-2627.
179. **Tatzelt, J.; Schätzl, H.** 2007. Molecular basis of cerebral neurodegeneration in prion diseases. *FEBS. J.* 274(3): 606-611.
180. **Taucher, E.** 1997. Capitulo 17: Prueba Ji – Cuadrado (χ^2) **In:** Bioestadística; Ed. Universitaria, Santiago Chile. (17): 145-150.
181. **Taylor, D.; Woodgate, S.** 2003. Rendering practices and inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22(1): 297-310.
182. **Terry, L.; Howells, L.; Hawthorn, J.; Edwards, J.; Moore, S.; Bellworthy, S.; Simmons, H.; Lizano, S.; Estey, L.; Leathers, V.; Everest, S.** 2009. Detection of PrP^{Sc} in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J. Virol.* 83(23): 12552-12558.
183. **Terry, L.; Howells, L.; Bishop, K.; Baker, C.; Everest, S.; Thorne, L.; Maddison, B.; Gough, K.** 2011. Detection of prion in the faeces of sheep. *Vet. Res.* 42(1): 65-70.
184. **Thomzig, A.; Schulz-Schaeffer, W.; Wrede, A.; Wemheuer, W.; Brenig, B.; Kratzel, C.; Lemmer, K.; Beekes, M.** 2007. Accumulation of

- pathological prion protein PrP^{Sc} in the skin of animals with experimental and natural Scrapie. PLoS Pathog. 3(5): 0659-0667.
185. **Thuring, C.; McElroy, M.; Sweeney, T.; Weavers, E.** 2000. Suitability of protuberances on the third eyelids of sheep as a biopsy site for lymphoid follicles. Vet. Rec. 147(22): 631-632.
 186. **Thuring, C.; van Keulen, L.; Langeveld, J.; Vromans, M.; van Zijderveld, F.; Sweeney, T.** 2005. Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep. J. Comp. Path. 132: 59-69.
 187. **Tixador, P.; Herzog, L.; Reine, F.; Jaumain, E.; Chapuis, J.; Le Dur, A.; Laude, H.; Béringue, V.** 2010. The physical relationship between infectivity and prion protein aggregates is strain-dependent. PLoS. Pathog. 6(4): 0859-0871.
 188. **Torres, J.M.; Brun, A.; Castilla, J.; Sánchez-Vizcaíno, J.M.** 2001. Enfermedades producidas por priones. [en línea] <<http://www.veterinaria.org/revistas/vetenfinf/bse/priones/priones.htm>> [consulta: 08-11-10].
 189. **Torres, J.M.; Andréoletti, O.; Lacroux, C.; Prieto, I.; Lorenzo, P.; Larska, M.; Baron, T.; Espinosa, J.C.** 2011. Classical bovine spongiform encephalopathy by transmission of h-type prion in homologous prion protein context. Emerg Infect Dis. 17(9): 1636-1644.
 190. **Tranulis, M.; Benestad, S.; Baron, T.; Kretzschmar, H.** 2011. Atypical prion diseases in humans and animals. Top. Curr. Chem. 305: 23-50.
 191. **Trevitt, C.; Singh, P.** 2003. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: pathology, epidemiology, and public health implications. Am. J. Clin. Nutr. 78(3): 651-656.
 192. **Tuo, W.; O'Rourke, K.; Zhuang, D.; Cheevers, W.; Spraker, T.; Knowles, D.** 2002. Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. PNAS 99: 6310-6315.
 193. **Tyler, J. W.; Weaver, D. M.; Turk, J. R.; O'Rourke, K. I.; Harrington, M. G.; Taylor, W.; Jenny, A.** 1999. Naturally occurring Scrapie in south down sheep. J. Vet. Intern. Med. 13: 213-216.

194. **Vaccari, G.; Panagiotidis, C.; Acin, C.; Peletto, S.; Barillet, F.; Acutis, P.; Bossers, A.; Langeveld, J.; Van Keulen, L.; Sklaviadis, T.; Badiola, J.; Andreóletti, O.; Groschup, M.; Agrimi, U.; Foster, J.; Goldmann, W.** 2009. State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet. Res.* 40(5): 48-57.
195. **Valdez, R.; Rock, M.; Anderson, A.; O'Rourke, K.** 2003. Immunohistochemical detection and distribution of prion protein in a goat with natural scrapie. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15 (2):157-162.
196. **van Keulen, L. J. M.; Vromans, M. E. W.; van Zijderveld, F.** 2002. Early and late pathogenesis of natural Scrapie infection in sheep. *APMIS* 110: 23-32.
197. **van Keulen, L.; Bossers, A.; van Zijderveld, F.** 2008a. TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet. Res.* 39 (4): 24-32.
198. **van Keulen, L.; Vromans, M.; Dolstra, C.; Bossers, A.; van Zijderveld, F.** 2008b. Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch. Virol.* 153: 445-453.
199. **Vargas, A.; Salto, R.; Sola, M.; Hortelano, P.** 2001. Encefalopatías espongiformes transmisibles. Bases moleculares, diagnóstico y perspectivas terapéuticas. *Ars. Pharmaceutica.* 42(1): 5-20.
200. **Vargas, F.; Luján, L.; Bolea, R.; Monleón, E.; Martín-Burriel, I.; Fernández, A.; De Blas, I.; Badiola, J.** 2006. Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd Eyelid biopsy. *J. Vet. Inter. Med.* 20: 187-193.
201. **Vascellari, M.; Aufiero, G.; Nonno, R.; Agrimi, U., Vaccari, G.; Basilicata, L.; Falcaro, C.; Mancin, M.; Marcon, S.; Mutinelli, F.** 2005. Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. *Arch. Virol.* 150(10): 1959-1976.
202. **Vascellari, M.; Nonno, R.; Mutinelli, F.; Bigolaro, M.; Di Bari, M.; Melchiotti, E.; Marcon, S.; D'Agostino, C.; Vaccari, G.; Conte, M.; De Grossi, L.; Rosone, F.; Giordani, F.; Agrimi, U.** 2007. PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J. Virol.* 81(9): 4872-4876.

203. **Velayos, J.; Irujo, A.; Cuadrado-Tejedor, M.; Paternain, B.; Moleres, F.; Ferrer, V.** 2010. Cellular prion protein in the central nervous system of mammals. Anatomoclinical associations. *Neurologia* 25(4): 228-233.
204. **Vidal, E.; Márquez, M.; Tortosa, R.; Costa, C.; Serafín, A.; Pumarola, M.** 2006. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages. *J. Virol. Met.* 134: 15-29.
205. **Vidal, E.; Acín, C.; Foradada, L.; Monzón, M.; Márquez, M.; Monleón, E.; Pumarola, M.; Badiola, J.; Bolea, R.** 2009. Immunohistochemical characterisation of classical scrapie neuropathology in sheep. *J. Comp. Path.* 141: 135-146.
206. **VLA, (Veterinary Laboratories Agency).** 2012a. Summary of all confirmed scrapie cases in the United Kingdom for the 2 year period prior to the current year. On line: <http://vla.defra.gov.uk/science/docs/sci_tse_stats_scrapie_uk.pdf> (Consulta: 05-junio-2012). 1 p.
207. **VLA, (Veterinary Laboratories Agency).** 2012b. Exotic species & domestic cats TSE surveillance statistics. On line: http://vla.defra.gov.uk/science/sci_tse_stats_exotic.htm (Consulta: 04-junio-2012)
208. **Vulin, J.; Biacabe, A.; Cazeau, G.; Calavas, D.; Baron, T.** 2011. Molecular typing of protease-resistant prion protein in transmissible spongiform encephalopathies of small ruminants, France, 2002-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17(1): 55-63.
209. **Wadsworth, J.; Hill, A.; Beck, J.; Collinge, J.** 2003. Molecular and clinical classification of human prion disease. *Br. Med. Bull.* 66(1): 241-254.
210. **Wadsworth, J.; Collinge, J.** 2007. Update on human prion disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1772: 598-609.
211. **Wadsworth, J.; Joiner, S.; Linehan, J.; Asante, E.; Brandner, S.; Collinge, J.** 2008. The origin of the prion agent of kuru: molecular and biological strain typing. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363(1510): 3747–3753.
212. **Wadsworth, J.; Dalmau-Mena, I.; Joiner, S.; Linehan, J.; O'Malley, C.; Powell, C.; Brandner, S.; Asante, E.; Ironside, J.; Hilton, D.; Collinge, J.** 2011. Effect of fixation on brain and lymphoreticular vCJD prions and bioassay of key positive specimens from a retrospective vCJD prevalence study. *J. Pathol.* 223(4): 511-8.

213. **Watts, J.; Balachandran, A.; Westaway, D.** 2006. The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog.* 2(3): 0152-0163.
214. **Westergard, L.; Christensen, H.; Harris, D.** 2007. The cellular prion protein (PrP^C): Its physiological function and role in disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1772(6): 629-644.
215. **WHO. (World Health Organization).** 2012. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. On line: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs180/en/>> (Consulta: 07-10-2012).
216. **Will, R.** 2002. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 62(3): 167-173.
217. **Will, R.** 2003. Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br. Med. Bull.* 66(1): 255-265.
218. **Williams, E.; Miller, M.** 2003. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals: origin, transmission and risk factors. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22(1): 145-156.
219. **Williams, E.** 2005. Chronic Wasting Disease. *Vet. Pathol.* 42: 530-549.
220. **Yang, T.; Jung, D.; Ahn, B.; Jeong, B.; Cho, H.; Kim, Y.; Na, D.; Geschwind, M.; Kim, E.** 2010. Familial Creutzfeldt-Jakob disease with V180I mutation. *Emerg. J. Korean Med. Sci.* 25(7): 1097-1100.
221. **Yokoyama, T.; Mohri, S.** 2008. Prion diseases and emerging prion diseases. *Curr. Med. Chem.* 15(9): 912-916.
222. **Zomosa-Signoret, V.; Arnaud, J.; Fontes, P. ; Alvarez-Martinez, M.; Liautard, J.** 2008. Physiological role of the cellular prion protein. *Vet. Res.* 39: 1-16.

10.- AGRADECIMIENTOS Y FINANCIACIÓN

Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

(#) FIV 12101401.9102.002 (G. Farías) 2008 – 2010; Dirección de Investigación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

(#) FIV 12101401.9102.009 (G. Farías) 2010 – 2012; Dirección de Investigación Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Deseo expresar mi agradecimiento a las instituciones y autoridades que hicieron posible realizar este Programa de Doctorado a través del convenio institucional entre sus distintas Facultades de Ciencias Veterinarias, las Universidades de Córdoba; de Concepción y de Chile

En forma especial expreso mi profundo y sincero reconocimiento al Dr. José Pérez Arévalo del Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica, Comparadas de la Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, por su buena disposición, tiempo, colaboración, dedicación y guía en la realización de este trabajo.

A la Unidad de Patología del Servicio Agrícola y Ganadero de Chile, por su buena disposición y ayuda, en especial a los Drs. Claudio Lecocq, Cecilia Jara, Paula Nuñez y personal de colaboración.

A todos los integrantes de la Unidad de Fisiopatología y Toxicología del Departamento de Patológica Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile.

A mis compañeros de Doctorado de Santiago y Chillán, con quienes compartimos los cursos de este Programa. En especial a su coordinador el Dr. Manuel Quezada, por su constante apoyo y estímulo.

A todos mis amigos y aquellas personas que de una u otra forma colaboraron para hacer posible la realización de esta Tesis.

***A la paciencia, comprensión, tiempo
y sacrificio de mi familia: Teresa,
Paola, Yannina, Antonia y Marcelo.
A mis padres Teresa y Gerardo+***

11.- ANEXOS

Anexo 1. Programa de procesamiento aplicado a las muestras de tejido linfoide e ovinos.

ESTACIÓN	REACTIVO	TEMPERATURA	DURACIÓN (min)
1	Alcohol 70°	A	120
2	Alcohol 90°	A	90
3	Alcohol 95° I	A	60
4	Alcohol 95° II	A	60
5	Alcohol 100° I	A	60
6	Alcohol 100° II	A	60
7	Alcohol 100° III	A	60
8	Xilol I	A	60
9	Xilol II	A	60
10	Xilol III	A	90
11	Parafina I	57° C	120
12	Parafina II	57° C	120

A= Temperatura ambiente.

Anexo 2. Procedimiento aplicado para la rehidratación de las muestras de tejido linfoide de ovinos para la tinción H-E.

SOLVENTE	TIEMPO INCUBACIÓN (min.)
Xilol I	3
Xilol II	3
Xilol III	5
Alcohol 100% I	3
Alcohol 100% II	3
Alcohol 95% I	3
Alcohol 95% II	3
Alcohol 70%	3
Agua Corriente	2- 3

Anexo 3. Protocolo para la tinción H-E.

Baño	TIEMPO INCUBACIÓN (min.)
Hematoxilina	5
agua corriente	5
Alcohol ácido	Pasada rápida
Agua corriente	10
Carbonato de litio	Hasta que núcleos se observen azules
Agua corriente	5
Eosina	5
Alcohol 95°	Pasada rápida
Alcohol 100°	1
Alcohol 100°	2
Xilol I	2
Xilol II	2
Xilol III	3

Anexo 4. Procedimiento aplicado para la rehidratación de las muestras de tejido linfóide de ovinos para la técnica de IHQ.

SOLVENTE	TIEMPO INCUBACIÓN (min.)
Xilol	5
Xilol	5
Alcohol 100%	4
Alcohol 100%	4
Alcohol 95%	3
Alcohol 80%	3

Anexo 5a. Registro de las muestras aptas y no aptas para IHQ obtenidas de cada ovino, a las distintas distancias desde la línea recto anal.

Muestra ovino N°	Distancia línea recto anal					Aptitud del ovino	N° cortes
	0,5cm.	1cm.	1,5cm.	2cm.	2,5cm.		
1	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
2	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
3	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
4	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta	No apto	0
5	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
6	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
7	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
8	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
9	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
10	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3
11	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
12	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
13	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
14	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
15	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
16	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
17	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
18	No apta	No apta	Apta	Apta	Apta	Apto	3
19	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
20	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta	No apto	0
21	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
22	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
23	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
24	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta	No apto	0
25	No apta	No apta	No apta	No apta	No apta	No apto	0
26	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
27	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
28	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
29	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
30	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3
31	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
32	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2

33	No apta	No apto	0				
34	No apta	No apto	0				
35	No apta	No apto	0				
36	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	4
37	No apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	2
38	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
39	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
40	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
41	No apta	No apto	0				
42	No apta	No apta	Apta	Apta	Apta	Apto	3
43	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
44	No apta	No apto	0				
45	No apta	No apto	0				
46	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
47	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3
48	No apta	No apto	0				
49	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
50	No apta	No apto	0				
51	No apta	No apto	0				
52	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
53	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	4
54	No apta	No apta	Apta	Apta	Apta	Apto	3
55	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
56	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
57	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
58	No apta	No apto	0				
59	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
60	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
61	No apta	No apto	0				
62	No apta	No apta	No apta	No apta	Apta	Apto	1
63	No apta	No apto	0				
64	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	4
65	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
66	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
67	No apta	Apta	No apta	No apta	Apta	Apto	2
68	No apta	No apto	0				
69	No apta	No apto	0				
70	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
71	No apta	No apto	0				
72	No apta	No apto	0				
73	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
74	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
75	No apta	No apto	0				
76	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
77	No apta	No apto	0				
78	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3
79	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3
80	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3
81	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
82	No apta	No apto	0				
83	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
84	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2

85	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
86	No apta	No apto	0				
87	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
88	No apta	Apta	No apta	No apta	Apta	Apto	2
89	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	4
90	No apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	2
91	Apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	4
92	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
93	Apta	No apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
94	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
95	No apta	No apta	No apta	No apta	Apta	Apto	1
96	Apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	2
97	No apta	Apta	No apta	No apta	No apta	Apto	1
98	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
99	Apta	Apta	Apta	No apta	No apta	Apto	3
100	No apta	Apta	Apta	Apta	No apta	Apto	3

Anexo 5b. Número de folículos linfoides por muestra según la distancia las distintas desde la línea recto anal y aptitud de las muestras para IHQ.

MUESTRA No	DISTANCIA RECTO ANAL					APTO/ NO APTO	Nº CORTES
	0,5 CM	1 CM	1,5 CM	2 CM	2,5 CM		
1	6	3	3	1	1	Apto	1
2	5	15	3	2	1	Apto	2
3	4	8	1	0	0	Apto	2
4	2	2	1	0	1	Apto	0
5	0	6	3	1	1	Apto	1
6	4	16	5	3	3	Apto	3
7	6	5	1	3	2	Apto	2
8	5	4	7	2	2	Apto	3
9	5	8	4	1	1	Apto	3
10	2	7	5	4	1	Apto	3
11	6	3	3	2	0	Apto	1
12	4	3	1	0	2	Apto	1
13	5	6	4	2	1	Apto	3
14	7	3	3	2	3	Apto	1
15	4	9	3	3	3	Apto	2
16	0	4	1	2	2	Apto	1
17	9	5	8	3	3	Apto	3
18	2	2	4	6	5	Apto	3
19	4	7	3	1	0	Apto	2
20	1	3	3	0	1	Apto	0
21	4	2	2	0	2	Apto	1
22	5	2	1	2	2	Apto	1
23	8	4	12	3	1	Apto	3
24	3	3	3	2	0	Apto	0
25	3	2	1	1	1	Apto	0

26	8	2	2	2	0	Apto	1
27	4	7	3	0	3	Apto	2
28	5	9	4	1	2	Apto	3
29	3	5	0	3	3	Apto	1
30	3	8	5	4	2	Apto	3
31	4	6	2	2	1	Apto	2
32	5	10	2	0	3	Apto	2
33	2	3	1	1	2	Apto	0
34	3	3	1	2	0	Apto	0
35	1	2	3	0	1	Apto	0
36	5	5	15	4	3	Apto	4
37	2	5	4	2	1	Apto	2
38	6	2	0	1	2	Apto	1
39	4	5	1	2	3	Apto	2
40	4	6	1	3	0	Apto	2
41	3	3	0	0	3	Apto	0
42	2	2	8	5	4	Apto	3
43	10	5	4	2	3	Apto	3
44	2	1	2	0	0	Apto	0
45	1	2	1	0	2	Apto	0
46	4	4	3	2	0	Apto	2
47	3	5	5	4	3	Apto	3
48	3	2	0	1	2	Apto	0
49	6	5	2	3	2	Apto	2
50	2	2	2	0	1	Apto	0
51	2	3	3	3	0	Apto	0
52	4	7	5	3	3	Apto	3
53	12	5	5	8	3	Apto	4
54	1	3	5	6	7	Apto	3
55	3	4	3	3	0	Apto	1
56	4	6	5	2	2	Apto	3
57	3	5	2	2	2	Apto	1
58	3	3	0	0	0	Apto	0
59	5	16	3	1	3	Apto	2
60	6	4	1	2	1	Apto	2
61	0	3	1	1	1	Apto	0
62	2	3	3	3	8	Apto	1
63	2	0	2	2	0	Apto	0
64	4	5	13	5	2	Apto	4
65	5	8	2	2	2	Apto	2
66	10	4	3	0	2	Apto	2
67	1	6	3	3	6	Apto	2
68	1	2	1	2	1	Apto	0
69	2	1	2	2	1	Apto	0

70	5	9	2	1	2	Apto	2
71	0	0	0	1		Apto	0
72	0	2	2	1	0	Apto	0
73	16	9	4	3	3	Apto	3
74	8	5	1	3	3	Apto	2
75	3	3	2	2	2	Apto	0
76	4	5	9	3	3	Apto	3
77	2	3	3	0	0	Apto	0
78	2	4	4	5	2	Apto	3
79	4	10	13	4	1	Apto	3
80	3	4	9	5	3	Apto	3
81	6	5	2	2	3	Apto	2
82	1	3	1	2	0	Apto	0
83	8	5	4	3	1	Apto	3
84	4	6	3	2	2	Apto	2
85	4	4	1	2	2	Apto	2
86	2	2	2	0	1	Apto	0
87	11	6	3	3	1	Apto	2
88	3	6	2	3	4	Apto	2
89	4	12	6	5	3	Apto	4
90	3	9	5	2	1	Apto	2
91	11	12	5	4	1	Apto	4
92	4	5	3	2	1	Apto	2
93	4	2	2	0	2	Apto	1
94	6	5	3	1	3	Apto	2
95	2	2	2	2	5	Apto	1
96	13	4	1	0	1	Apto	2
97	2	5	1	0	2	Apto	1
98	10	9	4	3	1	Apto	3
99	4	8	6	2	0	Apto	3
100	1	4	5	4	1	Apto	3
Suma	419	497	328	210	183		
Media	4,19	4,97	3,28	2,1	1,85		
DE	2,95	3,13	2,80	1,59	1,49		

Anexo 6. Análisis Estadístico.

Cálculo de ji – Cuadrado (χ^2) observado para el universo total de la muestras.

- a) **Tabla de contingencia entre la aptitud de la muestra con la distancia de corte de la mucosa al recto anal**

Respuesta	Distancia de Corte					Total
	0,5cm	1cm	1,5cm	2cm	2,5cm	
Apta	55	61	32	15	7	170
No apta	45	39	68	85	93	330
Total	100	100	100	100	100	500

$$\chi^2 = 103,0413 \text{ (P}<0,0001)$$

- b) **Tabla de contraste de dos en dos entre las distancias de corte de la mucosa al recto anal**

Contraste	DF	ji -Cuadrado	$P > \chi^2$
0,5 vs 1	1	1,01	0,3139
0,5 vs 1,5	1	11,37	0,0007
0,5 vs 2	1	42,67	< 0,0001
0,5 vs 2,5	1	73,70	< 0,0001
1 vs 1,5	1	19,86	< 0,0001
1 vs 2	1	60,84	< 0,0001
1 vs 2,5	1	100,60	< 0,0001
1,5 vs 2	1	8,37	0,0038
1,5 vs 2,5	1	22,11	< 0,0001
2 vs 2,5	1	3,32	0,0683

- c) **Comparación por pares mediante una prueba U de Mann-Whitney para el número de folículos linfoides por muestra según la distancia a la línea recto anal.**

	0,5 cm	1 cm	1,5 cm	2 cm	2,5 cm
0,5 cm		0,04	0,004	<0,0001	<0,0001
1 cm	0,04		<0,0001	<0,0001	<0,0001
1,5 cm	0,004	<0,0001		0,001	<0,0001
2 cm	<0,0001	<0,0001	0,001		0,22
2,5 cm	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,22	

12.- INFORME DIRECTORES



TÍTULO DE LA TESIS: Diagnóstico Preclínico de Scrapie mediante Inmunohistoquímica

DOCTORANDO/A: Gustavo Adolfo Farías Roldán

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La tesis doctoral se ha realizado entre los años 2008 y 2013, y ha sido fruto de la colaboración entre la Universidad de Córdoba y la Universidad de Chile, en esta última se han llevado a cabo todos los estudios laboratoriales y recogida de muestras. Hasta el momento los resultados de la tesis doctoral han dado lugar a la aceptación para la publicación en la revista indexada en JCR (Archivos de Medicina Veterinaria) del artículo: "Uso de la inmunohistoquímica para la búsqueda de proteínas priónicas en tercer párpado de ovinos en Chile". Parte de la revisión bibliográfica de la tesis ha sido publicada del libro titulado: "Principales enfermedades producidas por priones", publicado por una editorial de ámbito internacional: Editorial Académica Española (www.eae-publishing.com). También se ha redactado ya un artículo con los resultados de mucosa rectal, en los que también se ha realizado un estudio para evaluar la distancia más apropiada para la toma de muestras, y que será enviado próximamente a consideración para publicación en una revista indexada en JCR. Los directores consideramos que la tesis reúne los requisitos de calidad necesarios para su presentación con vistas a la obtención del título de doctor y autorizamos dicha presentación.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 16 de Abril de 2013

Firma del/de los director/es

Fdo.: José Pérez Arévalo Fdo.: Rafael Zafra Leva