

2. ENCEFALOPATÍAS ESPONXIFORMES TRANSMISIBEIS (EET)

Enrique A. González García

2.1. OS AXENTES CAUSANTES: OS PRIÓNS

Aínda que o axente causal, ao igual co scrapie das ovellas, é un prión, non é menos certo que algúns investigadores teñen postulado outros posibles axentes infecciosos menos probables. Entre eles foron implicados os seguintes: os virinos, axentes infecciosos constituídos por un ácido nucleico asociado estreitamente a proteínas propias das células ás que infectan; os virus filamentosos, que poderían estar integrados nos cromosomas de algúns animais, expresándose baixo determinadas condicións. Na actualidade sabemos que estas enfermidades (táboa 2.1) están causadas por un novo tipo de axente, de natureza exclusivamente proteica, aínda que con restos azucrados que conducen a diferentes grados de glicosilación, denominado prión. A proteína priónica PrP é unha proteína normal asociada ás membranas celulares, que se amosa máis abundante nas células do tecido nervioso e que resulta moi importante no desenvolvemento das encefalopatías esponxiformes transmi-

Táboa 2.1. Principais EET humanas e animais

HOSPEDADOR	ENFERMIDADE	ABREVIATURA SINÓNIMO
HUMANOS	Kuru	Kuru
	Creutzfeldt-Jakob	CJD - ECJ
	Gerstman-Sträusser-Sheinker	GSS - GSS
	Insomnio familiar fatal	FFI - IFF
	Insomnio fatal esporádico	SFI - IFE
OVINO E CAPRINO	Tembladeira, prurito lumbar ou scrapie	SC - SC
BOVINO	Encefalopatía esponxiforme bovina	BSE - EEB
VISÓN	Encefalopatía transmisible	MTE - ETV
GATO	Encefalopatía esponxiforme felina	FSE - EEF
CERVOS E ALCES	Debilidad crónica o caquexia crónica	CWD - CCCA
UNGULADOS SALVAXES	Encefalopatía esponxiforme	USE - EEU
FELINOS SALVAXES	Encefalopatía esponxiforme felina	FSE - EEF

Táboa 2.2. Transmisibilidade das EET humanas e animais

ENFERMIDADE	TRASMISIBILIDADE	CARACTERÍSTICAS
Kuru	Infeción	Canibalismo
ECJ esporádica	Mutación somática	Hereditaria ou esporádica
ECJ familiar	Mutación xerminal	Hereditaria
ECJ iatroxénica	Infeción	Trasplantes, hormonas, etc.
ECJ variante	Infeción	Carne contaminada
IFF	Mutación xerminal	Hereditaria ou esporádica
IFE	Esporádica	Esporádica
SGSS	Mutación xerminal	Hereditaria
SC	Infeción	Placentas, pastos, etc.
EEB-BSE	Infeción	Fariñas animais con EEB
ETV	Infeción	Pensos e feridas
EEF	Infeción	Alimentos con EEB
EUE	Infeción	Pensos con EEB
CCCA-CWD	Infeción	Mal establecidas

sibeis. As formas modificadas destas proteínas teñen capacidade infectiva, acumulándose no cerebro dos animais enfermos, causando lesións e interferindo na función das células nerviosas. Na táboa 2.2, indícanse os patróns de transmisibilidade e as características do contaxio das encefalopatías esponxiformes transmisibeis (EETs) humanas e animais.

¿Qué son os prións?. Non pertencen a ningún dos tipos de microorganismos coñecidos: parasitos, mofos, bacterias, virus. Non poden considerarse "seres vivos" nin portan compoñentes xenéticos localizados en ácidos nucleicos. Son axentes infectivos de natureza proteica que non desenvolven resposta inmune nos animais enfermos. Trátase de proteínas de baixo peso molecular con capacidade de "multiplicarse" ao producir cambios noutras proteínas normais existentes nos organismos ós que infectan, converténdooas en novos prións (figura 2.1). Os prións resisten tratamentos físicos (temperatura), químicos (ácido, etc.) e encimáticos (proteasas) sen perder infectividade (táboa 2.3). Causan encefalopatías esponxiformes, ao proliferar e acumularse na corteza do encéfalo, onde producen lesións con vacuolización do tecido cerebral, dándolle unha aparencia de esponxa. Os distintos tipos de prións amosan diferencias na súa composición aminoacídica, secuencia, grado de glicosilación e mobilidade electroforética. A figura 2.2 amosa unha representación esquemática da proteína prión non infectiva (Pr^{PC}) e infectiva (Pr^{PSC}), sinalando as diferencias na súa conformación respecto das rexións con hélices-alfa proteicas e láminas-beta proteicas.

Táboa 2.3. Resistencia das formas Pr^{Psc} infectivas de prión aos tratamentos físicos, químicos e enzimáticos

TRATAMENTOS SOBRE OS PRIÓN	EFFECTO SOBRE A INFECTIVIDADE
Radiacións UV	Non se inactivan: Infectivos
Radiacións ionizantes	Non se inactivan: Infectivos
Aquecemento a 80°C/1 hora	Perden pouca infectividade: Infectivos
Aquecemento a 100°C/1 hora	Perden pouca infectividade: Infectivos
Aquecemento a 132°C/2 horas	Inactívanse: Non infectivos
Aquecemento a 133°C/3 atm./20 min	Inactívanse: Non infectivos (r.UE)
Aquecemento 121°C/30 min NaOH 2M	Inactívanse: Non infectivos (SC)
Formol al 3,7%/ 4 horas	Inactiva o 90-95%: Infectivos
Urea, álcalis suaves e solventes	Perden infectividade: Infectivos
Deterxentes non iónicos, SDS, etc.	Non se inactivan: Infectivos
Hidroxilamina, Zn, quelantes	Non se inactivan: Infectivos
NaOH (1 a 2 Molar)	Inactívanse: Non infectivos
Hipoclorito sódico (0,5%)	Inactívanse: Non infectivos (EEB)
SDS con mercaptoetanol/100°C	Inactívanse: Non infectivos
Proteasas, Proteinasa K	Non se inactivan: Infectivos
Nucleasas (DNAsa, RNAsa)	Non se inactivan: Infectivos

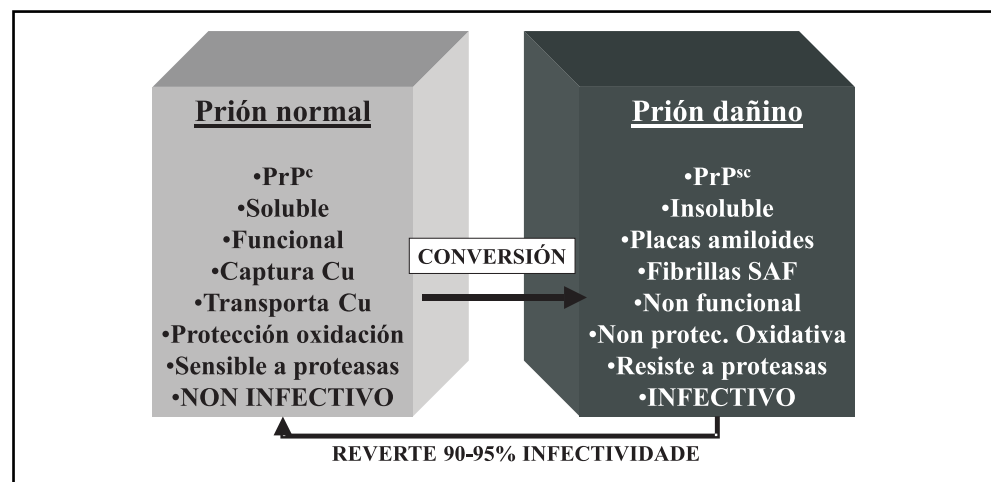


Figura 2.1. Proceso de "conversión" entre prións.

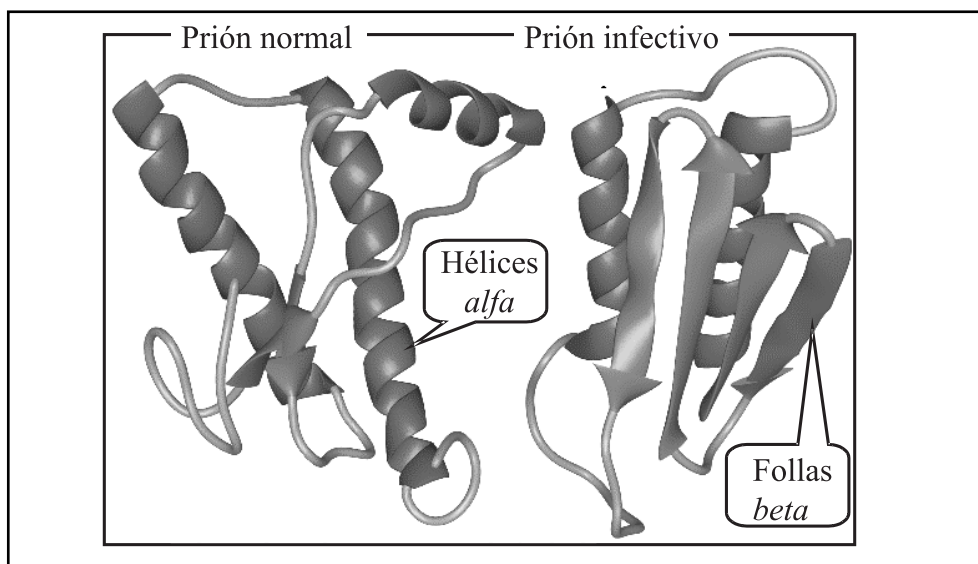


Figura 2.2. Representación da conformación normal (PrP^c) e infectiva (PrP^{sc}) da proteína prión (PrP).

2.2. PATOXÉNESE DAS EET: EVOLUCIÓN DA INFECCIÓN E TRANSMISIBILIDADE

Realizáronse experimentos con tenreiras inoculadas intracerebralmente con 100 gr de cerebro de vacas con EEB, estimándose que supón entre 10 e 100 veces máis inóculo co adquirido a través do penso contaminado. As mostras de 40 tipos de tecidos, obtidos das tenreiras despois do seu sacrificio, ensaiáronse en ratos para detectar infectividade. As últimas mostras foron ensaiadas despois de 40 meses de realizada a inoculación, estando clinicamente afectadas de EEB. Dende os 18 meses da infección, amosouse infectividade en mostras de intestino (íleo distal), cerebro, medula espiñal, nervios dorsais e ganglios trixeminais, existindo tamén unha moderada infectividade na medula ósea. A infectividade nalgunhas das mostras de tecidos comezou a observarse ós 6 meses da inoculación. Os signos clínicos empezaron a detectarse pronto, ós 35 meses trala infección, en comparación coa media duns 60 meses en que se detectan síntomas en animais que contraen a enfermidade de xeito non experimental.

Leváronse a cabo experimentos de desafío en tenreiras, destinados a verificala dose necesaria de axente infeccioso (cerebro de EEB) para reproducirla infección por vía alimenticia. As tenreiras alimentáronse con doses de 300 gr, 100 gr, 10 gr e 1 gr de extracto de cerebro positivo para EEB. Mantivéronse controladas e sen sometelas á tensión típica das ganderías de leite. Nos catro grupos de animais rexistráronse mortes por EEB. Tódalas tenreiras alimentadas con 300 gr e 100 gr do extracto, morreron de EEB. Dúas das tenreiras inoculadas con 10 gr e tres das inoculadas con 1 gr, non morreron de EEB, mantidas en observación ata os 26 meses trala inoculación. As doses entre 1 gr e 10 gr foron as que reproduciron a EEB cun período de incubación e desenvolvemento da enfermidade máis semellante ós casos de infección natural.

O bioensaio en rato, inoculando diversos tecidos de vacas afectadas de EEB, non amosou a mesma sensibilidade que a previamente determinada ao estudialo scrapie. Para ensaios rutinarios de infectividade, é necesario probar animais de experimentación que poidan substituí-lo uso de tenreiras. Pero o traspaso da barreira específica, no caso da EEB podería invalidalo ensaio en ratos como modelo de estudo desta EET. Xa que logo o extracto de cerebro de vacas con EEB matou de xeito máis eficiente ós ratos que calquera das cepas coñecidas de scrapie, cabería esperar que o mesmo

podería acontecer con outros tecidos periféricos e fluídos das vacas enfermas. Non foi así, a pesares de que no scrapie o bioensaio resultou útil para determinar a presenza de infectividade en varios tecidos. Este fallo pode ser debido á falta de doses de PrPEEB noutros tecidos do gando distintos ao sistema nervioso central, xa que ao procesar e tinguir estes tecidos non houbo ningún dato positivo de presenza de proteína anormal. Ao inocular intracerebralmente a ratos, comprobouse que estes eran unhas 1000 veces menos sensíbeis ao axente causante da EEB do que tiñan amosado se-las propias vacas.

Pódese analizar a transmisibilidade da EEB nos tres patróns posibles: Transmisión horizontal, que implicaría o paso da infección dun animal enfermo a outro sano por algún mecanismo de relación directa entre eles. Transmisión vertical de tipo xenético, que ocasionaría o paso da infección dun animal (pai ou nai) enfermo á súa descendencia, seguindo algún patrón hereditario específico. Transmisión paterno-materna, na que unha vaca ou un touro enfermo poderían transmitir a doenza ás crías, xa sexa polo seme do pai, na concepción, ou durante a xestación, ou tralo nacemento, por parte da nai. Anticipemos que non se dispón de probas definitivas que evidencien ou impliquen de xeito significativo a ningún destes patróns, senón, pola contra, de datos que aparentemente os descartan como probables.

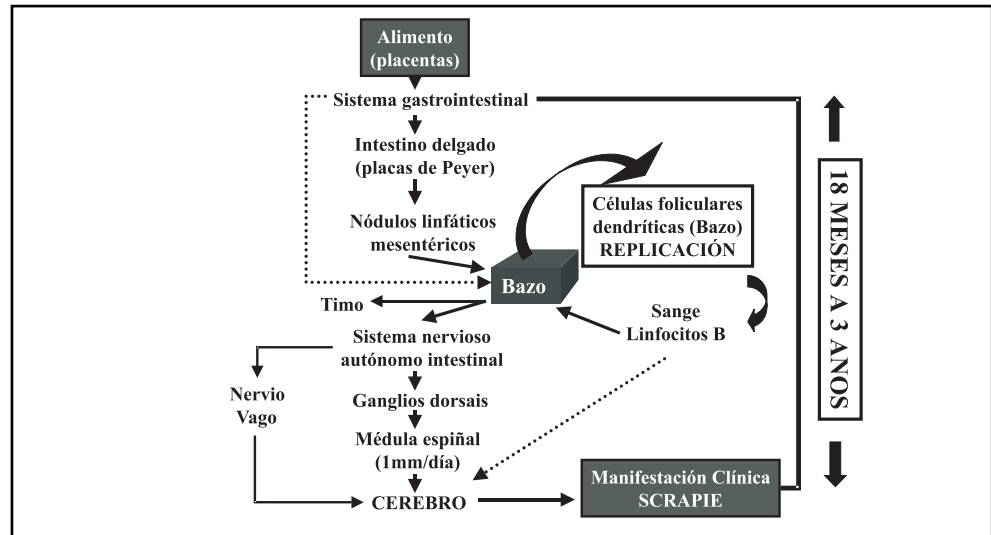


Figura 2.3. Desenvolvemento do scrapie en ovellas.



Figura 2.4. Características de desenvolvemento do scrapie experimental en ovellas, suando as vías de inoculación.

Transmisión horizontal da EEB

O feito de que dentro dun rabaño, a taxa de infección fose de soamente un 2'7% dos animais, nun período de estudio de 11 anos (Hoinville et al., 1995. *Veterinary Record*, 136: 312-318), é un bo indicador de que a transmisión de animal a animal non é un factor significativo. Se tivera lugar esta transmisión, os animais lactantes serían os de maior risco e as ganderías extensivas, con lactación xeneralizada dos animais de cría, presentarían maiores incidencias. No scrapie amosouse que a enfermidade transmitíase entre as ovellas ao alimentalas con placentas de ovellas enfermas. En estudos controlados, analizando a frecuencia coa que se daban casos positivos en tenreiros nados de vacas con EEB e en ambientes onde o contacto coa EEB era frecuente, non se obtiveron datos que implicaran a esta modalidade de transmisión. Ademais, alimentouse a tenreiros con pensos a base de placentas de casos confirmados de EEB, que foron sacrificados ao cabo de dous anos, e analizados, non tendo sido detectado nos mesmos ningún signo de enfermidade, infección ou presenza de lesións cerebrais.

Transmisión xenética da EEB

Ao realizar estudos epidemiolóxicos en lotes de cría de touros sans e lotes de cría de touros que resultaron positivos á EEB (Wilesmith, 1994. *New Zealand Veterinary Journal*, 42: 1-8), non se puido establecer relación algunha entre a incidencia e a orixe do seme. A análise da incidencia en rabaños inseminados artificialmente con seme de touros positivos e negativos para a EEB, non estableceu relación algunha da enfermidade co seme comercial. Tentouse transmitir experimentalmente a infección, empregando seme, vesículas seminais e próstata de touros confirmados como positivos para EEB, non conseguindo reproducila. Por outra banda, tanto os datos epidemiolóxicos como experimentais, obtidos durante os estudos levados a cabo no Reino Unido, tiñan sinalado que non existía evidencia algunha dunha implicación xenética na transmisión da infección. Neste caso, tampouco os compoñentes seminais resultaron implicados. En experiencias sobre scrapie, con animais xeneticamente ben caracterizados (roedores) detectouse maior ou menor sensibilidade segundo parámetros xenéticos dos animais, concretamente en base ao polimorfismo que pode presentar o xene da proteína prión.

Transmisión maternal da EEB

Os resultados baseados tanto nos estudos epidemiolóxicos de incidencia nos tenreiros nados de nai san e enferma, como en estudos específicos de investigación sobre a enfermidade, levados a cabo con vacas preñadas positivas para EEB, non teñen implicado significativamente este tipo de transmisión. No 1997, tras segui-la epidemia e con controles dende facía sete anos, observouse que o gando mostreado en matadoiro, procedente de lotes de cría de gando clinicamente enfermo, tiña un 9'6% máis de positividade co procedente de gando clinicamente libre de EEB. Parece existir una maior sensibilidade a sufrila infección neses animais. Aínda que non se puido demostrar definitivamente a transmisión da EEB das vacas enfermas ás súas crías, confirmando ademais que non había positividade nas crías de menos de dous anos de idade, os datos epidemiolóxicos suxeriron a posibilidade da existencia dalgún factor non recoñecido, de tipo maternal, como posíbel causa da transmisión da enfermidade, aínda que en baixas porcentaxes.

Na figura 2.3 esquematízase o proceso de desenvolvemento dunha encefalopatía esponxiforme transmisíbel, tomando como patrón o scrapie ovino, con indicación das principais vías de diseminación no animal durante o desenvolvemento da enfermidade ata o seu acceso ao sistema nervioso central. As conclusións xerais sobre o tipo de proceso desenvolvido segundo as vías iniciais de inoculación do prión resúmense na figura 2.4.



2.3. INFECTIVIDADE DOS PRIÓNS NOUTRAS ESPECIES ANIMAIS: CONCEPTO DE BARREIRA DE ESPECIE

Con independencia da menor sensibilidade dos ensaios en rato para determina-la infectividade da EEB, comparada coa mostrada para o scrapie, é un bioensaio válido e o único aplicábel a grandes cantidades de mostras. O test tense mellorado coa incorporación de ratos transxénicos, que portan xenos de proteínas PrP humanas ou bovinas, facéndoo moito mais rápido e sensíbel. Dende 1988 quedou establecida a transmisibilidade da EEB a ratos, mediante inoculación de tecido cerebral de vacas enfermas. Inicialmente, só se determinou infectividade en cerebro, medula espiñal e retina dos animais clinicamente enfermos. A inoculación por vía intracerebral a ratos, de sangue dos animais enfermos, non amosou infectividade.

Resulta interesante compara-las diferencias en infectividade, dos tecidos animais no caso de EEB e de scrapie, obtidos mediante ensaio en rato e agrupados por categorías de risco segundo determina a Organización Mundial da Saúde (OMS). Os tecidos de bovino con EEB ensaiados e probada a súa falta de infectividade en ensaio en rato son: Sangue (periférica, coagulada, fetal e soro), fluído cerebrospinal, tecido graxo, tecido gastrointestinal (abomaso, colon distal e proximal, esófago, intestino delgado distal e proximal, recto, retículo e rume), corazón, ril, fígado, pulmón, nódulos linfáticos (mesentéricos, prefemorais, retrofarínxeos), músculo, nervios (caudais e periféricos), páncreas, tecidos reproductivos de femias (leite, ovarios, placenta, fluído amniótico, fluído alantoico, mamario, uterino), pel, paxarela, traquea e tonsilas. A figura 2.5 indica os principais órganos linfoides do bovino, de posíbel implicación durante o desenvolvemento da enfermidade.

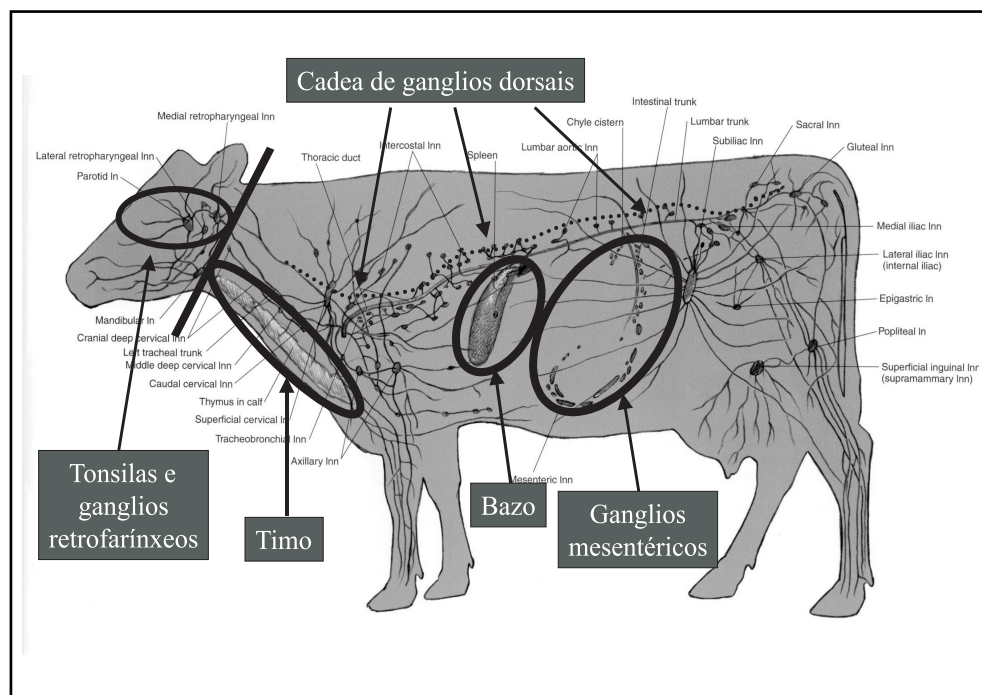


Figura 2.5. Órganos linfáticos de posible implicación no desenvolvemento da EEB no gando bovino.

Pola contra, a infectividade en tecidos de ovinos con scrapie, segundo clasifica a Organización Mundial da Saúde (OMS) son: CATEGORÍA I, de alta infectividade: miolos e medula espiñal. CATEGORÍA II de infectividade media: íleo, nódulos linfáticos, colon proximal, paxarela, tonsilas, duramáter, glándula pineal, placenta, fluído cerebrospinal, pituitaria, glándula adrenal. CATEGORÍA III, de infectividade baixa: Colon distal, mucosa nasal, nervios periféricos, medula ósea, fígado,

pulmón, páncreas, timo. CATEGORÍA IV, a infectividade da cal non foi detectada: Sangue periférica, feces, corazón, ril, glándula mamaria, leite, ovarios, cuspe, glándulas da saliva, vesículas seminais, soro, músculo esquelético, testículos, tiroide, útero, tecidos fetais, bile, oso, cartilaxe, tecido conectivo, pelo, ouriños.

Tentouse transmiti-la EEB a outras especies animais con dous obxectivos: 1) Identifica-los animais sensíbeis alternativos, cubrindo distintas especies, para experimentar en laboratorio, no caso de que non se puidese utiliza-lo gando bovino. Entre estes, incluíronse tamén as cepas de ratos que tiñan servido para estudos sobre o scrapie, ben coñecidos e que tan bos resultados tiñan ofertado nas investigacións sobre esta EET. 2) Analiza-la posibilidade de que a epidemia do gando bovino puidera estenderse a outros animais, avaliando dito perigo en función da sensibilidade doutras especies de produción e domesticación a contraela enfermidade. A maioría dos animais foron inoculados por vía parenteral (intracerebral, intravenosa e/ou intraperitoneal), ademais de facelo por vía oral. A infección parenteral acadouse en rato, tenreira, ovella, cabuxos, porcos, visóns, monos (marmosets, araña e macaco); a infección oral en ratos, vacas, ovelas, cabuxos, visóns e lémmures. Non resultaron sensíbeis por esta última vía nin os hamsters (que si eran sensíbeis tras un pase previo en rato), nin as pitas, nin os porcos.

Tense amosado a existencia do efecto denominado de barreira de especie nas EETs, ao tratar de transmitir estas enfermidades a animais de distinta especie daquela da que se obtiña o inoculo. Ao inocular un prión nunha nova especie susceptíbel, o tempo de incubación é moito máis longo que cando se infecta cun prión obtido doutro animal da mesma especie. No caso da encefalopatía esponxiforme transmisíbel do visón (ETV) por inoculación intracerebral, o paso de visón a visón tivo un período de incubación de 130 a 230 días, mentres que o paso de visón a háms-ter demostrou un período de incubación de aproximadamente 600 días. No traspaso da barreira de especie débense ter en conta catro factores que amosan ter unha grande transcendencia: 1) Cantidade relativa de cadansúa cepa de prión no inoculo. 2) Interacción de cepas co tecido do novo hospedador. 3) Patoxenicidade relativa de cada cepa para o hospedador. 4) Competición entre cepas ao interactuar coas células do novo hospedador. Comprobouse que a barreira de especie queda eliminada ao te-la mesma secuencia o prión e a PrP do hospedador. No caso específico da EEB, o recoñecemento de que se trata dunha única cepa de prión a causante da enfermidade, tanto no bovino como en felinos e en humanos, parece amosar unha grande capacidade de acceso e adaptación para causa-la encefalopatía en novas especies (figura 2.6).

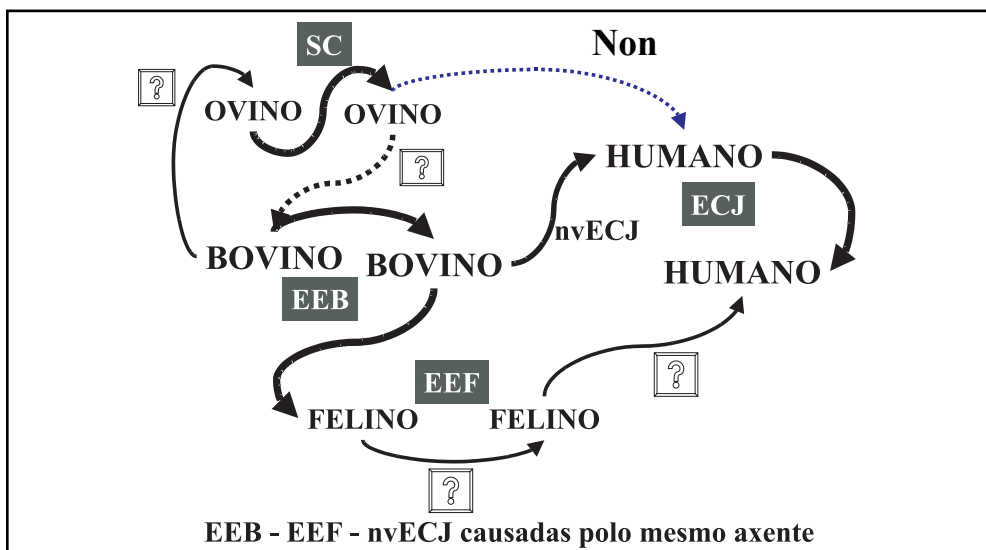


Figura 2.6. Salto da barreira de especie na EEB.

A transmisión iatroxénica, é dicir, por intervención veterinaria ou médica, sospeitase que tivo lugar nos casos de scrapie, mediante a utilización de vacinas contaminadas contra "louping-hill" e contra a agalactia ovina. Esta vía de transmisión quedou claramente establecida en diversos casos da enfermidade de Creutzfeldt-Jakob (ECJ): En 1960, por diversas intervencións cirúrxicas; en 1974, por transplantes de córnea, en 1977, por reutilización de electrodos intracraniais, que tiñan sido esterilizados polo sistema de elección para este tipo de instrumental; en 1978 por tratamentos con hemoderivados; en 1986, por tratamentos con hormona de crecemento que tiña sido obtida de cadáveres entre os que se demostraría había algúns con ECJ; en 1998, por transplantes de duramáter procedentes dun donante que padecera ECJ.

2.4. CARACTERÍSTICAS XENÉTICAS E SUSCEPTIBILIDADE DE DOS ANIMAIS ÁS EET

No caso do prurito lumbar ovino ou scrapie, tense visto que o período de incubación da enfermidade está regulado por un xene chamado *sinc* (xenes homólogos, PrP e sip). O xene *sinc* coñécese dende 1968 e regula o período de incubación do scrapie. Nos estudos levados a cabo en ovellas e ratos viuse que o período de incubación era de 100 a 690 días segundo a raza das ovellas. Nos ratos, o período de incubación resultaba de 140 a 280 días segundo cepas de scrapie e os propios ratos que se empregaban. O xene *sinc* ten 2 alelos: *s7* e *p7*. Para a cepa de scrapie ME7, o período de incubación está regulado do seguinte xeito: os animais homocigotos *s7 s7*, presentan un período de incubación corta; os homocigotos *p7 p7*, unha incubación larga; os heterocigotos *s7 p7* y *p7 s7*, unha incubación intermedia. Na figura 2.7 indícanse as variacións (polimorfismo) de aminoácidos de determinadas posicións na proteína do príon ovino, e cómo este polimorfismo repercute sobre a resistencia do ovino a contrae-la infección, así como sobre o período de incubación da enfermidade (táboa 2.4).

Os condicionantes xenéticos da enfermidade Creutzfeldt-Jakob nos seres humanos son tamén parcialmente coñecidos. O xene do príon humano (PRPN), de 16.000 bases, está localizado no cromosoma 20. A proteína normal PrPc está codificada en

Polimorfismo nos codons nº 136, 154 e 171 do xene *sinc*

<u>CODON</u>			<u>FENOTIPO DO ANIMAL</u>
136	154	171	
V	Q	R	➤ Ovella pouco resistente ao SC
A	R	R	➤ Ovella resistente ao SC
A	R	Q	➤ Ovella resistente ao SC

A = Alanina Q = Glutamina V = Valina R = Arxinina



Figura 2.7. Polimorfismo xenético en ovellas Suffolk e susceptibilidade a contrae-lo scrapie.

Taboa 2.4. Polimorfismo de xenes que codifican para PrP e modulan o scrapie causado pola cepa SSBP/1 en ovellas Cheviot.

Combinación CODON 136	De xenes CODON 171	Bioensaio en Incubación media (días)	Rato: infectividade Período de incubación (días)
V / V	Q / Q	170	70 – 230
V / A	Q / Q	270	160-340
V / A	Q / R	364	280 – 540
A / A	Q / Q	> 998	Indeterminado
A / A	Q / R	> 828	Indeterminado
A / A	R / R	> 1149	Indeterminado

V= valina; A= alanina; Q= glutamina; R= arxinina

só 759 bases dese xene e o polipéptido traducido constitúeno só 253 aminoácidos. Coñécense mutacións puntuais, que cambian a conformación da PrPc nun único aminoácido, dando lugar á PrPSC. Coñécense 25 formas polimórficas do PRPN que non conducen á aparición de PrPSC. As mutacións en PRPN poden ter lugar en células da liña xerminal (esperma, óvulos) ou en células da liña somática, dando lugar ós patróns de transmisión de tipo hereditario ou á aparición ocasional da enfermidade. O polimorfismo xenético do PRPN no home, determina a susceptibilidade do individuo a sufrila enfermidade, a cal pode ser distinta incluso segundo as razas humanas e o predomino de determinados polimorfismos entre os seus membros.

2.5. PROBAS DE DETECCIÓN E DIAGNÓSTICO DA EEB

Comecemos precisando que ningún dos tests desenvolvidos ata a data poden dar resultados definitivos sobre se o animal ou a súa canal está libre de prión da EEB, xa que só serven para verificar cándoo é positivo para a presenza de encefalopatía esponxiforme desenvolvida no animal. O período medio de incubación da EEB en vacas é de 5 anos, polo que non cabería agardar presenza do prión no sistema nervioso central, como para dar resultados positivos, ata aproximadamente uns 30 meses trala infección. Isto pode ocorrer na aplicación dos tests ás vacas sacrificadas en matadoiro entre os 18 e os 24 meses de idade, que loxicamente darán resultados negativos. O resultado do test pode ser "falso negativo" e confundir, non dando seguridade de que o animal non estea infectado (baixa sensibilidade), aínda que tódolos tests homologados dan un 100% de correlación coa presenza de lesións cerebrais típicas da EEB. As mostras de animal necesarias para aplica-los tests na EEB, teñen que ser de tecido cerebral, que é de onde resultan efectivas para determina-la presenza de proteínas anormais do prión. Non resultan útiles, como no scrapie, outros tecidos do tipo de ganglios linfáticos, tonsilas ou paxarela, dos que poder obter mostras por biopsia previa ao sacrificio. Ademais, no caso da EEB, estes tecidos interfíren co desenvolvemento dos tests, invalidando os resultados.

A proba definitiva de diagnóstico para a EEB é a análise histopatolóxica do tecido cerebral dos animais sacrificados. Calquera outra proba que se aplique deberá constatare con esta, para a determinación de lesións esponxiformes no animal positivo, segundo as normas de diagnóstico do manual da Unión Europea para o control da EEB.

Outras probas recomendadas e homologadas para a súa utilización pola Unión Europea son: o test de Western-blot (Prionics), que é a aplicación ao diagnóstico da electroforese en xel, para determinar bandas de dixerido de proteínas. A proba de SAF (scrapie associated fibrils), que consiste nunha proba específica de micros-



copía electrónica para determina-la presencia de fibrilas de deposición do prión. O test ICC (inmunocitoquímico), realizado sobre cortes de tecido cerebral, con reactivos específicos para determina-la presencia de depósitos amiláceos ocasionados pola acumulación do prión. O cadro 2.1 recolle unha descrición destes tests.

Ata a data non se teñen desenvolvido probas de laboratorios que resulten útiles para a análise do gando san coa finalidade de detecta-la presenza da enfermidade antes do sacrificio. Algúns dos tests deste tipo, aínda en desenvolvemento, están en etapas previas á súa autorización como métodos de control da EEB, debendo aínda amosa-la súa fiabilidade e sensibilidade nos estudos de campo con animais sans e enfermos en distintos períodos do desenvolvemento da encefalopatía.

Outros tests analizados pola Comisión da Unión Europea para a súa aplicación ao control da EEB son: Test CEA, trátase dun inmunoensaio de sándwich, do tipo do ELISA. É útil para aplicar en mostras de cerebro. Estase experimentando para determinar proteínas priónicas en parede intestinal, cerebro e medula espiñal de animais infectados, xa que é un test de grande sensibilidade. Podería servir para detecta-la infección en etapas mais temperás. Este test ten sido avaliado positivamente e recomendado. Test de Wallac-EG & G. Wallace, denominado como DELFIA, que resulta moi sensíbel pero extremadamente complicado para aplicalo de rutina en laboratorios de control veterinario. Este test foi avaliado negativamente pola Unión Europea, xa que non ofrecía un 100% de seguridade no diagnóstico, como fixeron os outros autorizados. Outra proba na que aínda se está a traballar na súa posta a punto, xa en fase de probas de campo, é a Inmunolectroforese capilar (ICE), que é un test excelente para o scrapie, con grande sensibilidade, pero non validado para aplicalo á EEB, de momento. Outras alternativas no estudio son os tests baseados na detección de marcadores fisiolóxicos derivados da existencia do prión, a partir de mostras de ouriños; os tests baseados na análise do incremento de determinadas proteínas específicas na medula espiñal, derivadas do estado de enfermidade. Tamén se están a realizar probas analíticas de metabolitos no sangue do animal, que manifesten especificamente un estado de enfermidade causado pola EEB.

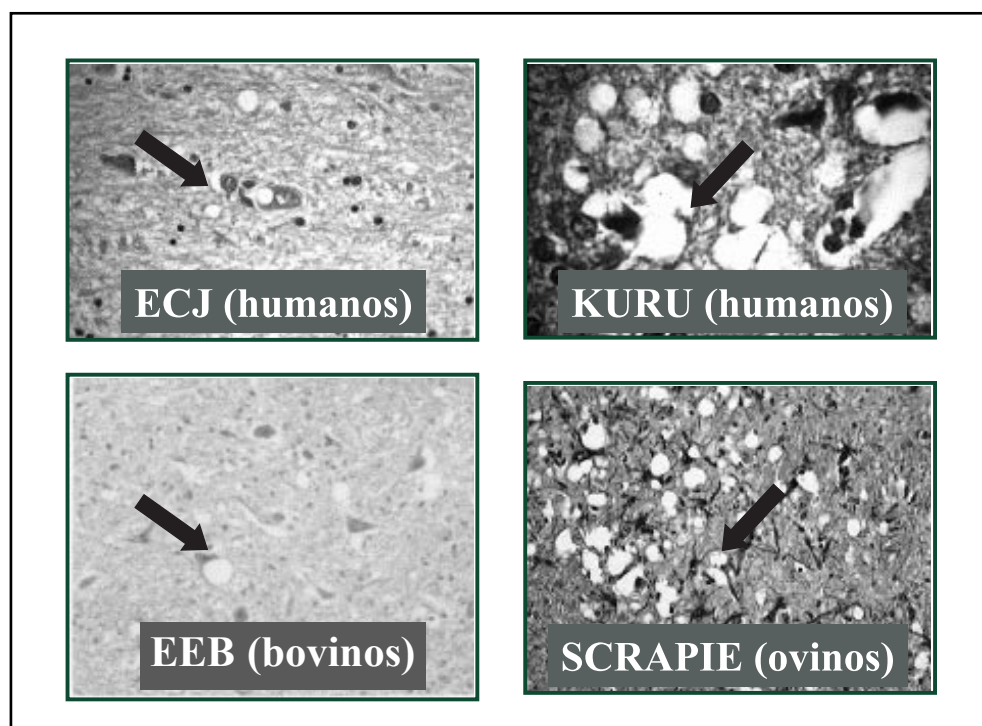


Figura 2.8. Cortes histopatolóxicos de cerebro con lesións e vacuolización debida a encefalopatías esponxiformes (EETs) humanas e animais.

Cadro 2.1

Proba Histopatolóxica

É unha proba post-mortem. Require material cerebral da vaca sospeitosa, que debe ser tratado e preservado en formalina. Tínguense os cortes de tecido cerebral e obsérvanse ao microscopio óptico para detecta-la presenza de lesións tisulares características da EEB. A vacuolización da cortiza cerebral, detectada nos cortes histolóxicos, revela a presenza de encefalopatía esponxiforme (figura 2.8). Calquera grado de deterioro da mostra de cerebro, previa ao exame histopatolóxico, invalida os resultados da observación microscópica.

Proba de SAF (fibrilas asociadas ao scrapie)

É unha proba post-mortem. SAF (scrapie associated fibrils) é un test derivado das investigacións do scrapie nas ovellas, no que se busca a presenza dunhas "fibrilas" moi características no caso de que a enfermidade estea presente. Estas fibrilas non son mais que acumulacións de prións que adquiren dita estrutura fibrilar ao acumularse nas células cerebrais. Require mostras de tecido cerebral do animal sospeitoso, que deben ser preparadas para observación ao microscopio electrónico. Utilízase tecido fresco, non fixado previamente (non serven as mesmas mostras fixadas con formalina, empregadas para a proba histopatolóxica clásica). A proba funciona ben, mesmo no caso de que as mostras de tecido cerebral amosen algún signo de deterioro ou descomposición.

Test Prionics

Consiste nunha proba de Western-blot que se realiza sobre tecido cerebral, do que se extraen as proteínas e se establece o seu patrón electroforético en xeles de acrilamida (figura 2.9). Tárdase unhas 24 horas (6 horas para o desenvolvemento do test), na práctica, para obter o resultado. Este test está recomendado para analiza-las mostras de tecido cerebral de animais sospeitosos que morren nas explotacións, así como os sacrificados para consumo, como un test complementario da histopatoloxía. É unha proba destinada especificamente á detección do prión PrPSC, comparando esta proteína coa súa forma normal non infectiva PrPC. O test inclúe unha electroforese das proteínas extraídas do tecido cerebral das vacas sospeitosas e a súa posterior transferencia a un soporte (papel ou sintético) para o seu tinguido. A detección lévase a cabo mediante un anticorpo específico, unha vez transferidas as bandas de proteína obtidas da electroforese ao soporte de papel. Este test podería aplicarse a mostras doutros tecidos, pero as únicas recomendadas para a detección de EEB son as de cerebro, para as que o test ten sido totalmente validado. Outras mostras posíbeis dan interferencias co test ou este non resulta suficientemente sensíbel e específico, non sendo de fiar os resultados obtidos.

Test de Enfer Scientific

Este laboratorio ten desenvolvido unha proba de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), empregando anticorpos doutra firma comercial (Proteus). É moi sensíbel, rápido e máis sinxelo de realizar co Western-blot, ofrecendo resultados en menos de 24 horas. Ademais, a súa aplicación a un grande número de mostras admite a automatización. Estúdiouse a efectividade con mostras de medula espiñal de animais sacrificados para consumo humano, así como os sacrificados nas campañas de erradicación de EEB en Irlanda.

Proba inmunocitoquímica

É outra proba post-mortem. Realízase con cortes de tecido cerebral, previamente tratado con formol. Lévese a cabo directamente sobre os cortes de tecido cerebral, non necesitando pasos de purificación das proteínas da mostra. Utiliza anticorpos específicos para PrPSC, detectando a súa presenza directamente sobre os cortes histolóxicos ao observalos ao microscopio. A proba inmunocitoquímica pode ser aplicada sobre outros tipos de mostras, que no caso das ovellas ofreceu bos resultados (tonsilas, ganglios linfáticos ...). Non obstante, sábese que algunhas ovellas deron resultados falsos positivos xa que as súas proteínas normais interferían no ensaio e eran detectadas como posíbeis prións.



2.6. CONCLUSIÓNS SOBRE O COÑECEMENTO ACTUAL DAS EET

No cadro 2.2 resumimos algúns dos aspectos a lembrar sobre a EEB. Tendo en conta o coñecemento acumulado sobre o scrapie ovino, sobre as EETs humanas e, dende 1986, os datos revelados pola epidemia de EEB en Gran Bretaña, podemos extraer algunhas conclusións importantes, a grandes liñas, sobre as encefalopatías esponxiformes transmisibéis, as súas peculiaridades como enfermidades de nova acuñación e os seus condicionantes de cara á transmisibilidade entre especies. Estas conclusións, que trataremos nas seguintes liñas, teñen sido coidadosamente expostas no volume 2 "Science" do informe denominado "BSE Inquiry", encargado polo goberno inglés ós expertos no tema, para analiza-lo período 1986-2000 da epidemia de EEB e os coñecementos acumulados durante o mesmo.

Ditas conclusións podemos resumilas nos seguintes puntos:

- Está implicado o sistema reticuloendotelial, onde se leva a cabo a replicación inicial do prión cando a vía de entrada é non-neuronal.
- O prión multiplícase especificamente nas células dendríticas da paxarela, téndose localizado tamén nos linfocitos B que só transportan o prión entre os nódulos e órganos linfáticos. Por inoculación oral de tecido infectado de EEB, detectouse infectividade ós 45 días nas placas de Peyer do intestino, e ós 75 días en diversos órganos do sistema reticuloendotelial.
- Os prións da EEB penetran polas placas de Peyer e espállase vía linfática ós nódulos linfáticos mesentéricos, dende onde pode estenderse por vía sanguínea a outros lugares de replicación no sistema reticuloendotelial.
- O prión do scrapie en rato, tras replicarse na paxarela, disemínase polo sistema nervioso autónomo ata os ganglios prevertebrais (dorsais), desde os que accede á medula espiñal.
- Outra alternativa observada no scrapie natural en ovellas, é que o prión acceda directamente ao cerebro a través do nervio vago, ao que chegaría dende as fibras nerviosas dos ganglios mesentéricos, sen necesidade de entrar na medula espiñal.
- Unha alternativa válida nas EETs é que o prión chegue ao cerebro dende o bazo ou outros órganos linfoides, transportado polos linfocitos B.
- A predisposición xenética (polimorfismo) a contrae-la enfermidade, tense visto que é moi importante nas EETs, particularmente nas humanas, sexan hereditarias, esporádicas ou iatroxénicas, tendo sido tamén amosada no scrapie ovino.
- As propias características xenéticas do individuo parece ser que determinan a predisposición a sufrir-la EET, no caso de entrar en contacto co prión. Na EEB aínda non se sabe cómo pode estar regulado este factor de predisposición a desenvolve-la doenza.
- Para rematar, o xene doppel, identificado en humanos e en rato, ligado ao PRPN, é similar para tódalas proteínas prión coñecidas, podendo se-lo modulador da enfermidade dependendo do polimorfismo do hospedador.



Cadro 2.2

Alguns aspectos a lembrar da EEB

Orixe, Transmisibilidade e Detección

Orixe da EEB:	En 1986 na Gran Bretaña
Axente causal:	Prión (do vacún ou adaptado do scrapie)
Vehículo:	Fariñas de carne e oso (pensos)
Transmisibilidade:	Si, é unha encefalopatía transmisíbel
Animais afectados:	Bovinos, felinos e ungulados de zoolóxico
Afección no home:	Responsábel da nvECJ
Animais susceptíbeis:	Segundo aspectos xenéticos do hospedador
Detección in vivo:	Sintomatoloxía clínica en etapas avanzadas
Detección in vitro:	Test post-mortem in vitro con tecido cerebral
Confirmación da EEB:	Análise histopatolóxica do cerebro

Transmisión a Humanos

Por inxestión de materiais de risco de bovinos enfermos: miolos, medula espiñal, tonsilas, ganglios retrofarínxeos, intestino, canle medular do espiñazo, paxarela ou timo. Estes materiais poderían ser ampliados no futuro.

Materiais especificados de risco (MER)

As autoridades sanitarias españolas, en cumprimento das disposicións da Unión Europea para o control da EEB, teñen declarado como materias de risco os seguintes órganos e tecidos do gando bovino (B.O.E. nº 283, de 25 de novembro de 2000):

- O cráneo, incluídos o encéfalo e os ollos, as amígdalas, a medula espiñal e o íleo dos bovinos de mais de doce meses de idade.
- O cráneo, incluídos o encéfalo e os ollos, as amígdalas, a medula espiñal e o íleo dos ovinos e caprinos de mais de doce meses de idade, nos que na enxiva teña feito erupción un incisivo definitivo, así como a paxarela dos ovinos e caprinos de tódalas idades.
- Os cadáveres dos bovinos de mais de doce meses e os ovinos e caprinos de calquera idade.

2.7. AGRADECEMENTOS

Desexo expresar o meu agradecemento ao labor realizado pola Prof. M^a Celia Besteiro Rodríguez, Secretaria da Facultade de Veterinaria de Lugo, na tradución e revisión do artigo ao galego, así como na recompilación da normativa legal (BOE, DOG) sobre a EEB, que se inclúe.



2.8. BIBLIOGRAFÍA

- The Phillips report on BSE and vCJD. *Lancet*, 2000, 356:1535.
- Ashraf H. BSE inquiry uncovers "a peculiarly British disaster". *Lancet*, 2000, 356: 1579-1580.
- Berche P. Emergence of new infectious diseases: The microbiologist's point of view. *Annales De Pathologie*, 2000, 20/4: 295-296.
- Doherr, M.G. et al. Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record*, 1999, 145/23: 672.
- Griffin J. Epidemiology of bovine spongiform encephalopathy in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 2000, 53/10: 529-532.
- Katamine S. Physiopathology and molecular diagnosis for prion diseases. *Rinsho Byori*, 2000, 48/5: 437-441.
- Keshet, G.I. et al. The cellular prion protein colocalizes with the dystroglycan complex in the brain. *Journal of Neurochemistry*, 2000, 75/5: 1889-1897.
- Kitamoto T. Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathology*, 2000, 20/Suppl: S52-S54.
- Klein M.A. and Aguzzi A. The neuroimmune interface in prion diseases. *News in Physiological Sciences*, 2000, 15: 250-255.
- Klein R. The politics of risk: the case of BSE. *British Medical Journal*, 2000, 321:1091-1092.
- Li A.M. et al. Physiological expression of the gene PrP-like protein, PrPLP/Dpl, by brain endothelial cells and its ectopic expression in neurons of PrP-deficient mice ataxic due to purkinje cell degeneration. *American Journal of Pathology*, 2000, 157: 1447-1452.
- K., et al. Expression and structural characterization of the recombinant human dopel protein. *Biochemistry*, 2000 39/44:13575-13583.
- MAAF Publications. Bovine spongiform encephalopathy (BSE). Advisory notes for farmers. Crown copyright 1999-PB4710-E.
- Michelistch and Weissman. A census of glutamine/asparagine-rich regions: Implication for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97/22: 11910-11915.
- Miller M.W. et al. Epizootiology of chronic wasting disease in free-ranging cervids in Colorado and Wyoming. *Journal of Wildlife Diseases*, 2000, 36/5: 676-690.
- Minor P.D., Will R.G. and Salisbury D. Vaccines and variant CJD. *Vaccine*, 2000, 19:409-410.
- Moorby J.M., Dhanoa M.S. and Austin A.R. Aspects of the metabolism of dairy cows during the inoculation of bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record*, 2000, 147/15: 409-412.
- Nakamura Y. et al. Epidemiologic features of 65 Creutzfeldt-Jakob disease patients with a history of cadaveric duramater transplantation in Japan. *Epidemiology and Infection*, 2000, 125/1: 201-205.
- Orge L. et al. Similarity of the lesion profile of BSE in Portuguese cattle to that described in British cattle. *Veterinary Record*, 2000, 147/17: 486-488.
- Painter M.J. Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Journal of Infection*, 2000,



- Reynaert H., Burt A. and Geerts A. Prions in activated hepatic stellate cells: not a surprise after all. *Journal of Hepatology*, 2000, 33/21: 838-841.
- Rodríguez-Ferri E.F. Priones, un nuevo tipo de agente transmisible. *Producción Animal*, 2001, 162:3-19.
- Stevenson M.A. et al. Descriptive spatial analysis of the epidemic of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain to June 1997. *Veterinary Record*, 2000, 147/14: 379-384.
- Taylor D.M. et al. Infectivity in the blood of mice with BSE-derived agent. *Journal of Hospital Infection*, 2000, 46/1: 78-79.
- Wong B.S. et al. Cooper refolding of prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 276/3: 1217-1224.

Información adicional actualizada sobre a EEB puede obtenerse de las siguientes páginas de Internet:

- Bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. A progress report. Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods (MAFF). Gran Bretaña.
<http://www.maff.gov.uk/animalh/bse/index.html>
- BSE Inquiry, Vol. 2 "Science". MAAF Publications. Gran Bretaña.
<http://www.maff.gov.uk/animalh/bse/index.html>
- Food Standards Agency web site. www.bsereview.org.uk
- Información eeb. Administración general del Estado. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. España. <http://www.eeb.es>
- Information concerning BSE for scientific world. <http://sparc.airtime.co.uk/bse/>
- MAFF BSE information web site. Gran Bretaña. <http://www.maff.gov.uk/animalh/bse-science/level-4-bse.html>
- Opinion adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 27-28 November 2000. http://europa.eu.int/comm/food/fs/ssc/outcome_en.html
- Report on the implementation of latest BSE control measures in the member states. The European Commission.
http://europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/press/press
- SCAD Plus: Salud pública y sanidad animal. EEB: situación actual y perspectivas.
<http://europa.eu.int/scadplus/leg/es/lvb/112043.htm>



2.9. APÉNDICE: RECENTE NORMATIVA ESTATAL E GALEGA RELACIONADA COA EEB

- Orde do 22 de novembro de 2000 pola que se declara oficialmente a existencia da enfermidade encefalopatía esponxiforme bovina. D.O.G. nº 228, de 24 de novembro de 2000.
- Real Decreto 1910/2000, de 24 de noviembre, por el que se crea la Comisión Interministerial de Seguridad Alimentaria. B.O.E. nº 283, de 25 de novembro de 2000.
- Real Decreto 1911/2000, de 24 de noviembre, por el que se regula la destrucción de los materiales especificados de riesgo en relación con las encefalopatías esponxiformes transmisibles. B.O.E. nº 283, de 25 de novembro de 2000.
- Orde do 27 de novembro de 2000 pola que se establecen as indemnizacións por sacrificio obrigatorio dos animais como consecuencia da declaración oficial da existencia da enfermidade encefalopatía esponxiforme bovina. D.O.G. nº 231, de 29 de novembro de 2000.
- Resolución de 1 de diciembre de 2000, de la Subsecretaría, por la que se dispone la publicación del Acuerdo del Consejo de Ministros de 1 de diciembre de 2000, por el que se determinan los criterios generales para la negociación y suscripción de Convenios de colaboración específicos con las Comunidades Autónomas, y otras medidas, para instrumentar las acciones de lucha contra la encefalopatía esponxiforme bovina. B.O.E. nº 289, de 2 de decembro de 2000.
- Decreto 286/2000, do 1 de decembro, polo que se crea o Consello Galego de Seguridade Alimentaria. D.O.G. nº 236, de 5 de decembro de 2000
- Resolución do 10 de novembro de 2000 pola que se acorda publica-la estratexia galega de xestión de residuos. D.O.G. nº 236, de 5 de decembro de 2000.
- Orde do 7 de decembro de 2000 pola que se establecen as compensacións complementarias como consecuencia da declaración oficial da existencia da enfermidade encefalopatía esponxiforme bovina. D.O.G. nº 238, de 11 de decembro de 2000.
- Orden de 15 de diciembre de 2000 por la que se establecen los baremos de indemnización por sacrificio obrigatorio de los animales sospechosos o afectados de encefalopatías esponxiformes transmisibles. B.O.E. nº 303, de 19 de decembro de 2000.
- Orden de 20 de diciembre de 2000 por la que se regulan las subvenciones a la retirada del mercado nacional de harinas animales. B.O.E. nº 305, de 21 de decembro de 2000.
- Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el Programa Integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías esponxiformes transmisibles a los animales. B.O.E. nº 307, de 23 de decembro de 2000.
- Orden de 28 de diciembre de 2000 por la que se establece el plan de adquisición de bovinos de más de treinta meses a los que no se les haya practica-

- do la prueba de detección de la EEB. B.O.E. nº 313, de 30 de decembro de 2000.
- Decreto 296/2000, do 7 de decembro, polo que se aproba o Regulamento da Inspección de Consumo. D.O.G. nº 3, de 4 de xaneiro de 2001.
 - Orde do 26 de decembro de 2000 pola que se regula o réxime de autorización como xestor de residuos das actividades transformadoras de desperdicios de orixe animal e animais mortos. D.O.G. nº 3, de 4 de xaneiro de 2001.
 - Decreto 298/2000, do 7 de decembro, polo que se regula a autorización e notificación de produtor e xestor de residuos de Galicia e se crea o Rexistro Xeral de Produtores e Xestores de Residuos de Galicia. D.O.G. nº 4, de 5 de xaneiro de 2001.- Corrección de erros. Decreto 298/2000, do 7 de decembro, polo que se regula a autorización e a notificación de produtor e xestor de residuos de Galicia e se crea o Rexistro Xeral de Produtores e Xestores de Residuos de Galicia. D.O.G. nº 17, de 24 de xaneiro de 2001.
 - Orden de 26 de diciembre de 2000 por la que se crea la Mesa de Coordinación de las Ayudas Ganaderas en los sectores de la carne de vacuno y de ovino y caprino. B.O.E. nº 5, de 5 de xaneiro de 2001.
 - Instrucción do 5 de xaneiro de 2001 para a aplicación do artigo 10.1º do Real decreto 3454/2000, polo que se establece e regula o programa integral coordinado de vixilancia e control das encefalopatías esponxiformes transmisibles ós animais. D.O.G. nº 6, de 9 de xaneiro de 2001.
 - Orde do 8 de xaneiro de 2001 pola que se establecen as indemnizacións por sacrificio obrigatorio dos animais como consecuencia da declaración oficial da existencia da enfermidade encefalopatía esponxiforme bovina. D.O.G. nº 6, de 9 de xaneiro de 2001.
 - Orden de 12 de enero de 2001 por la que se desarrolla el anexo XI del Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el Programa Integral Coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías esponxiformes transmisibles de los animales. B.O.E. nº 12, de 13 de xaneiro de 2001.
 - Real Decreto 3478/2000, de 29 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales. B.O.E. nº 17, de 19 de xaneiro de 2001.
 - Instruccions para a aplicación da Orde do 12 de xaneiro de 2001, pola que se desenvolve o anexo XI do Real decreto 3454/2000. D.O.G. nº 15, de 22 de xaneiro de 2001.
 - Orden de 31 de enero de 2001 por la que se complementa la Orden de 28 de diciembre de 2000 por la que se establece el plan de adquisición de bovinos de más de treinta meses a los que no se les haya practicado la prueba de detección de la EEB. B.O.E. nº 28, de 1 de febreiro de 2001.
 - Real Decreto-Ley 4/2001, de 16 de febrero, sobre el régimen de intervención administrativa aplicable a la valorización energética de harinas de origen animal procedentes de la transformación de despojos y cadáveres de animales. B.O.E. nº 42, de 17 de febreiro de 2001.
 - Orden de 21 de febrero de 2001 por la que se suprime el requisito del aval



previsto en la Orden de 28 de diciembre de 2000, por la que se establece el plan de adquisición de bovinos de más de treinta meses a los que no se les haya practicado la prueba de detección de la EEB. B.O.E. nº 47, de 23 de febrero de 2001.

- Orden de 22 de febrero de 2001 por la que se determinan con carácter transitorio los supuestos excepcionales de inhumación previstos en la disposición final tercera del Real Decreto 3453/2000, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles a los animales. B.O.E. nº 48, de 24 de febrero de 2001.
- Orden de 22 de febrero de 2001 por la que se determinan los supuestos excepcionales de incineración previstos en la disposición final tercera del Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles a los animales. B.O.E. nº 48, de 24 de febrero de 2001.

