

ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA Y SU DIAGNÓSTICO: REVISIÓN

Pinto, Gabriel B.^{a,b,c}; Espinoza, Jorge^a; Juliá, Selene^c; Blanco Viera, F. Javier^c; Aponte, Pedro M.^{a,b*}

^a AGROCALIDAD, Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad – AGROCALIDAD, Laboratorio de Diagnóstico Animal, Km 14^{1/2} Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, Tumbaco, ECUADOR

^b SENESCYT, Secretaría Nacional de Educación Ciencia y Tecnología / Proyecto Prometeo, ECUADOR

^c Laboratorio de Referencia OIE para las EETs, Instituto de Virología “Scholein Rivenson”, INTA, Castelar, ARGENTINA

Ingresado: 30/04/2015

Aceptado: 03/09/2015

Resumen

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) son un grupo de enfermedades neurológicas degenerativas, para las cuales no existe cura y cuyo desenlace siempre es fatal. Las EETs pueden afectar tanto a humanos como a animales de interés pecuario (vacas, ovejas y cabras), domésticos (gatos) o salvajes (ciervos, visones y alces), incluyendo diversos animales de zoológico en cautiverio (antílopes, felinos, lémures y mono rhesus). Si bien el Scrapie es una enfermedad que se conoce hace mucho tiempo en los ovinos, la aparición de la encefalopatía en el ganado bovino y su posterior pasaje al humano, ha convertido a estas enfermedades en prioritarias por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Como consecuencia, muchos países comenzaron a desarrollar estudios de riesgo y programas de vigilancia activa para establecer su situación respecto a las EETs y particularmente a la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) con el objetivo de ser categorizados según su nivel de Riesgo por la OIE. Esto tiene implicaciones en el comercio internacional de productos y subproductos provenientes de bovinos. Para el éxito del programa es fundamental el desarrollo de técnicas de diagnóstico para detección inmunoquímica e inmunohistoquímica.

Palabras clave: Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), diagnóstico, Inmunoquímica, Inmunohistoquímica.

BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY AND ITS DIAGNOSIS: REVIEW

Abstract

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) is a group of neurological degenerative diseases for which there is no cure and whose outcome is always fatal. Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) can affect both humans and animals, either livestock (cows, sheep and goats), domestic (cats) and wildlife animals (deer, mink and moose), including various animals living in zoos (antelopes, cats, lemurs and rhesus monkey). While Scrapie in sheep is a disease known long time ago, the onset of encephalopathy in cattle and its subsequent passage to humans was raised to priority level by the World Organization of Animal Health (OIE). As a result, many countries began to develop risk studies and active surveillance programs to establish their status regarding TSEs and particularly bovine spongiform encephalopathy (BSE) with the objective of being categorized according to their level of risk by the OIE. This has implications for international trade in products derived from cattle. The development of diagnosis techniques such as immunochemical and immunohistochemical techniques are critical for the success of this program.

Keywords: Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), diagnosis, Immunochemistry, Immunohistochemistry.

I. INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) se caracterizan por ser enfermedades neurológicas degenerativas, para las cuales no existe

* Correspondencia a: Pedro Aponte, AGROCALIDAD, Laboratorio de Diagnóstico Animal, Km 14^{1/2} Vía Interoceánica, La Granja, MAGAP, Tumbaco, Ecuador. Teléfono: ++593 02 2372844, ext 223. Correo electrónico: apontep@gmail.com

cura y cuyo desenlace siempre es fatal. Las EETs pertenecen a un grupo de enfermedades infecciosas que pueden afectar tanto a humanos como a animales, ya sea de interés pecuario (vacas, ovejas y cabras), domésticos (gatos) o salvajes comociervos, visones y alces llamada en estos casos Enfermedad Emaciante de los Ciervos (en inglés Chronic Wasting disease, CWD), afectando así mismo a diversos animales que viven en cautiverio en jardines zoológicos (antílopes, felinos, lémures y monos rhesus) (Tabla I).

El Scrapie, la forma en que se presenta la EET en ovejas y cabras, es la que se conoce desde hace más tiempo.

Recién a mediados del siglo XX se describe por primera vez el Kuru, una enfermedad espongiiforme de los humanos que afectaba a aborígenes que practicaban rituales de canibalismo en Papua Nueva Guinea, y la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD), una demencia progresiva y pre-senil [1, 2 y 3], encontrándose semejanzas entre ellas.

Tabla I. Tabla correspondiente a las diferentes Encefalopatías Espongiiformes Transmisibles (EETs) en especies animales y al humano y su nomenclatura, año de descripción y autor.

Enfermedad	Especies Afectadas	Año	Autor – Cita	Siglas
“Scrapie” clásico	Ovinos, muflones y caprinos	1732	Parry – [40]	---
“Scrapie” atípico		1998	Benestad et al. – [41]	---
Encefalopatía Espongiiforme del Bovino	Bovino doméstico	1988	Wilesmith, John – [42]	EEB
Encefalopatía de los Ungulados Exóticos	Antílopes: Nyala, gran kudu, orix, gemsbok y eland.	1986	Kirkwood, James y Cunningham, Andrew – [43]	EUE
Encefalopatía Espongiiforme del Felino	Felinos: doméstico. De captura: puma, león, tigre, chita, ocelote y gato dorado de Asia	1991	Wyatt et al.- [44]	EEF
Encefalopatía Espongiiforme del Visón	Visones	1947	Hartsough & Burger -[45]	EEV
Enfermedad Emaciante Crónica de los ciervos	Ciervos de pelo blanco y de pelo negro y alce	1967	Williams, Elizabeth y Young, Stuart – [46]	EEC
Kuru	Humanos	1957	Vincent Zigas y Carleton Gajdusek – [47]	---
Enfermedad de Creutzfeldt Jakob	Humanos	1920 1921	Hans-Gerhard Creutzfeldt – [1] Alfons Maria Jakob – [2]	CJD
Variante de la enfermedad Creutzfeldt Jakob (adquirida)	Humanos	1995	Hill et al., 1997 –[48] Collinge et al. [49]	vCJD
Síndrome de Gerstmann Straüssler Scheinker (genético)	Humanos	1936	Gerstmann, J.; Straussler, E.; Scheinker, I – [50]	GSS
Insomnio Familiar Fatal (genético)	Humanos	1986	Lugaresi et al. – [51]	IFF

A partir del brote de la encefalopatía espongiforme del bovino (EEB) y sus consecuencias de grandes pérdidas económicas, ocurrido en Inglaterra en la década del 80, estas enfermedades tomaron altísima relevancia. Sumado a esto, a mediados de los '90, la transmisión de EEB a personas que habían consumido carne contaminada, exacerbó la situación, poniendo en evidencia que EEB había cruzado la barrera de especie, creando una nueva variante de la enfermedad priónica en humanos (variante de Creutzfeldt-Jakob: vCJD) [4] y convirtiendo la EEB en una zoonosis [5].

Los alimentos balanceados para animales fabricados a base de harinas de carne y hueso y contaminados con EEB y/o Scrapie, causaron también la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF) tanto en gatos domésticos como en grandes felinos en cautiverio, así como la encefalopatía en especies de ungulados (EUE) en zoológicos (Antílopes y gacelas) [6].

Las distintas hipótesis presentadas sobre el posible agente causal de estas enfermedades no pueden explicar completamente sus características, siendo, hasta ahora, la hipótesis presentada por Prusiner en 1982, la más aceptada. En ella se postula la existencia de un agente patogénico no convencional, una proteína llamada Prion (PrP), término que deriva de partículas proteináceas infectivas. Esta hipótesis se basa en las propiedades moleculares de este agente, diferente a la de los virus, viroides y plásmidos, dada su resistencia a los procesos que degradan ácidos nucleicos, su resistencia a la inactivación por calor, y su pequeño tamaño, sugiriendo que se trataría de un agente no convencional [7].

La proteína priónica celular (PrP^c) es sintetizada normalmente por la célula y digerida por enzimas intracelulares. La proteína priónica infectiva (PrP^{Sc}) tiene la misma secuencia aminoacídica que PrP^c pero una estructura tridimensional diferente, cambio conformacional que le confiere una especial resistencia a la degradación, llevando a su acumulación en las células del sistema nervioso central (SNC), acompañada de lesiones histopatológicas características. Todas las EETs conocidas se caracterizan por una acumulación de la proteína priónica y vacuolización del SNC en las etapas finales de la enfermedad; son enfermedades de evolución rápida, siempre fatales, para las cuales no se conoce cura o prevención. Sin embargo, muy recientes descubrimientos generan la esperanza de lograr alternativas terapéuticas, ante el hecho que existe al menos una variante natural de la proteína priónica capaz de prevenir la aparición del cuadro clínico [8]. La posibilidad de generar una vacuna que prevenga la enfermedad se ha planteado y es buscada activamente en la actualidad [9], sin embargo existiendo numerosos aspectos técnicos y fisiológicos que resolver, tal como el

hecho de que la proteína priónica infectante no solo afecta al sistema nervioso, sino que interfiere con el sistema inmune, como por ejemplo la afectación del diálogo de señales bioquímicas en la activación de linfocitos T bovinos durante una infección experimental [10]. Otra posibilidad explorada experimentalmente es el uso de proteínas priónicas heterólogas (provenientes de otra especie animal) las cuales aparentemente interfieren con el reclutamiento de las proteínas priónicas normales (PrP^c) del animal a ser protegido a fin de evitar su transformación en priones infectivos (PrP^{Sc}) [11]. Hasta el momento actual, no existen técnicas que permitan su diagnóstico *ante mortem*, siendo éste necesariamente *post mortem*. Ante la sospecha de la enfermedad, en base a los signos clínicos, la misma debe ser confirmada por histopatología del tejido cerebral y/o por técnicas que utilizan anticuerpos monoclonales o policlonales para la detección de la proteína priónica infectiva PrP^{Sc} (inmunohistoquímica y Western blot).

Los cerebros de individuos enfermos presentan alteraciones microscópicas, mostrando características de degeneración con lesiones espongiformes, astrogliosis y acumulación de depósitos de proteína patogénica. A pesar de estas características comunes, el tiempo de incubación y la patología varían considerablemente entre los diferentes desórdenes originados por priones, y estos fenotipos distintivos (o cepas para el agente) parecen propagarse fielmente, aun después de repetidos pasajes en animales experimentales [12].

Si bien las EETs forman un grupo de enfermedades de baja prevalencia en las especies hospedadoras, el hecho de que la EEB se haya transmitido a otros hospedadores, inclusive el humano (vCJD), las ha convertido en un foco de atención para el público, los profesionales de la salud pública y animal y las administraciones públicas [13].

Las EETs animales más comunes agrupan al Scrapie en ovejas y cabras, EEB o "vaca loca" en el ganado bovino y CWD en ciervos, siendo CJD la enfermedad priónica más común en humanos. Una importante característica de los priones es que éstos generalmente se transmiten de una especie a otra con una eficiencia mucho menor que dentro de la misma especie [14]. A esta transmisión ineficiente a una especie diferente se la conoce como barrera de especie [5]. Para los priones, la transmisión intra-especie fue demostrada en los años '30, mientras que la transmisión entre especies pudo ser demostrada con el desarrollo de los ratones transgénicos [15] y recientemente ratones normales [16]. Esta última, aunque menos eficiente, puede ser superada tras varios pasajes, reflejando la adaptación progresiva del prion a su nuevo hospedador. Esto además fue confirmado con la aparición de la vCJD en humanos demostrando la

capacidad del prion de cruzar la barrera y propagarse en otra especie [15,17,18]. A pesar que la secuencia de aminoácidos de la PrP así como su estructura tridimensional están altamente conservadas entre las especies de mamíferos, los priones no pasan fácilmente de una especie a otra ya que una mínima diferencia de la secuencia aminoacídica tiene un alto impacto en la eficiencia de transmisión. Del mismo modo, tanto la cepa del prion como la ruta de infección constituyen factores críticos que pueden actuar al momento de cruzar la barrera de especies [15,19, 20] incluso existiendo la posibilidad de mantenerse reservorios en animales silvestres susceptibles [21].

Con el desarrollo de modelos animales, se observó que existe una barrera inter-especies para las EETs, que puede vencerse con la dosis y vía de exposición adecuadas [22]. Incluso, cuando la proteína priónica patogénica bovina pasa por otra especie como la oveja, se hace más virulenta [23].

En función de lo expuesto anteriormente, se llega a las siguientes características, compartidas por todas las enfermedades que agrupan las EETs [24]:

- a) Transmisibilidad oral natural o al menos transmisibilidad experimental documentada.
- b) Largos períodos de incubación sin síntomas y con presentación de síntomas en las etapas finales de la enfermedad como consecuencias de las lesiones en el SNC.
- c) La presencia de lesiones histopatológicas características (vacuolas) en regiones específicas del cerebro durante la fase clínica de la enfermedad.
- d) La acumulación de isoformas estructuralmente modificadas (parcialmente resistentes a la enzima proteinasa k) de una proteína fisiológica (proteína priónica celular, PrP^c) principalmente en el cerebro.
- e) La ausencia de una respuesta inmune contra el agente infeccioso.
- f) La falta de un tratamiento preventivo o terapéutico.

II. ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA (EEB)

En el año 1985 fue observado y posteriormente descrito el primer caso de EEB en Gran Bretaña, caracterizándose por desórdenes neurológicos progresivos en el ganado adulto y por cambios patológicos, principalmente vacuolización de la sustancia gris del tallo cerebral y astrogliosis [24].

La hipótesis más aceptada sobre la aparición de EEB en el ganado bovino es el traspaso de alguna cepa de Scrapie a ser infectiva para el ganado bovino, y que una vez dentro del sistema de "rendering", el agente infeccioso podría haber sido reciclado y acumulado a través del alimento conteniendo proteína derivada de los despojos y carcasas de origen ovino y bovino,

principalmente en la forma de harinas de carne y hueso [13]. Esto dio como resultado el brote masivo ocurrido en Gran Bretaña en las décadas '80 y '90 que se vio reflejado en un enorme problema económico, social y político, ya que la enfermedad fue encontrada en más de 30.000 animales cada año en la epicrisis de la enfermedad durante los años 1992 y 1993 y que fue decreciendo como resultado de las medidas adoptadas para controlar la enfermedad [5]. Si bien los estudios epidemiológicos evidenciaron que las harinas de carne y hueso son las principales rutas de infección, no se excluye la posibilidad de transmisión maternal o los sustitutos lácteos como fuente de infecciones [25]. Como consecuencia de la implicación de las harinas de carne y hueso y la aparición de la enfermedad, se prohibió este tipo de alimentación, resultando en una notable disminución de nuevas infecciones en el ganado nacido después de implementar esta medida. Debido a que por unos años, se continuó con la exportación tanto de ganado como de harinas de carne y hueso desde Gran Bretaña, la enfermedad pudo dispersarse a Europa y a otros países. Actualmente se ha reportado en muchos países, aunque con una menor incidencia, pero incluyendo animales tanto importados como nativos. La emergencia de una nueva forma de enfermedad priónica en humanos (vCJD) en Gran Bretaña también demostró estar relacionada con el agente de la EEB, considerándose la exposición con la dieta (carne bovina contaminada) como la ruta de infección [26]. La ocurrencia de EETs en especies exóticas de bovinos y felinos bajo cautiverio así como en gatos domésticos, muestra haber sido originada por el agente de EEB, presumiéndose que la exposición ha sido a través de la dieta [26, 27]. De esta manera fue evidente que EEB había cruzado la barrera de especie. El gran aumento de muestras analizadas en los programas de vigilancia activa para EEB así como el refinamiento de los métodos de diagnóstico, permitieron la identificación de dos nuevas formas de EETs, llamadas EEB atípicas. Si bien la EEB fue considerada por mucho tiempo como una enfermedad causada por un único agente infeccioso causando un perfil de lesiones bien típicas y mostrando un único patrón de glicosilación para la proteína priónica resistente (PrP^{res}), estudios más recientes reportaron casos con características de PrP^{res} diferentes, siendo estos de dos tipos: 1- Tipo H, caracterizado por una masa molecular de PrP^{res} sin glicosilar de mayor masa molecular [28]; 2- Encefalopatía Espongiforme Amiloide Bovina (BASE) descrita por primera vez en Italia [29] que se denomina Tipo L y que se caracteriza por poseer una masa molecular menor que PrP^{Sc}. Estos casos atípicos fueron encontrados en países que implementan grandes sistemas de vigilancia activos [25].

El origen de estas nuevas formas todavía no se conoce

aunque se han planteado algunas hipótesis como la ocurrencia de un cambio importante en el agente original de EEB, origen de otra fuente tal como el Scrapie de ovejas y cabras, o una forma previa no conocida en el ganado (ya sea debido a la exposición del agente o una forma espontánea de EET) [25]. Sumado a esto, se han reportado dos casos de EEB en cabras infectadas naturalmente, uno en Francia [30] y otro en una cabra Escocesa [31], y otros posibles reportes [32] así como casos atípicos de Scrapie en diferentes países.

III. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico clínico de EEB puede ser muy difícil de realizar dada la gran variedad de signos clínicos que se pueden presentar, los cuales pueden a su vez estar influenciados por el estado del animal, la cepa del agente y factores ambientales [26]. Por este motivo, para el diagnóstico de la enfermedad debe reconocerse el agente infeccioso. Si bien la demostración de PrP^{Sc} constituiría la identificación del agente, por definición, la transmisión a partir de tejido infectado, generalmente inyectándolo a roedores de laboratorio, es la única prueba biológica disponible de detección de la infectividad. Aunque este criterio resulta poco práctico para fines diagnósticos, la caracterización biológica de la transmisión es un componente importante para la definición de alguna nueva variante fenotípica emergente de EEB y para distinguir casos de estos en bovinos y EEB en ovejas y cabras reportadas en casos experimentales [27].

Actualmente, el diagnóstico de la enfermedad priónica puede realizarse con un diagnóstico estático, en el cual distintas técnicas son usadas para el diagnóstico *post mortem* [33], basándose en los cambios microscópicos observados en los cerebros de los individuos infectados, el diagnóstico activo, en el cual se amplifica PrP^{Sc}, o la infectividad, *in vivo* o *in vitro*, ya sea por inoculación intracerebral en ratones, por el ensayo celular (para EEB o Scrapie) o por la técnica de PMCA (Protein Misfolding Cyclic Amplification) [34].

Por lo tanto, la detección de PrP^{Sc} puede realizarse por distintos métodos [35]:

- La presencia de las fibrillas características a través de microscopía electrónica (SAF) en tejidos en caso de *Scrapie* con menor sensibilidad en EEB.
- Inmunotransferencia – western blot (inmunoblot – WB) en homogenatos de cerebro.
- Inmunohistoquímica (IHC) en secciones de tejidos fijados e incluidos en parafina

Mientras que muchos métodos inmunobioquímicos, también llamados test rápidos, son usados para el screening en bovinos, los otros mencionados (SAF, WB

e IHC) son considerados oficialmente como pruebas confirmatorias dependiendo de la especie [34].

Sin embargo, diagnósticos no concluyentes, la ausencia de cambios histológicos característicos, o de la detección de PrP^{Sc}/SAF según el método diagnóstico utilizado y la especie susceptible, no confirman la ausencia de la enfermedad sino que la concordancia entre resultados de múltiples enfoques diagnósticos provee la mejor garantía de exactitud. Claramente, en una situación de monitoreo donde se busca evidencia de la ausencia de EEB en rumiantes, debería ser necesario aplicar múltiples criterios diagnósticos y utilizar en forma complementaria dos métodos de laboratorio en la confirmación de muestras de tejido del SNC (histopatología e IHC o WB) para mantener un alto grado de confiabilidad en los resultados negativos [27]. La acumulación de PrP^{Sc} en tejido linfóide en los estadios relativamente tempranos de *Scrapie* fueron inicialmente utilizados para diagnóstico *ante-mortem* usando biopsia de la tonsila palatina, aunque actualmente se han obtenido biopsias exitosas de tejido linfóide del tercer párpado [32] y de tejidos linfoides más accesibles a nivel del recto [36] para diagnósticos *ante-mortem* de rumiantes menores, siendo imposible la aplicación de este método para los casos de EEB. Actualmente se intentan generar modelos animales a fin de mejorar los sistemas de diagnóstico. Recientemente, se utilizó un modelo en primates no-humanos en el cual se logró la expansión de la población de priones a través de la técnica de amplificación cíclica de mal-plegado de la proteína priónica [37].

3.1 Diagnóstico Histopatológico

El diagnóstico histopatológico se realiza a partir de muestras de SNC fijadas en formol, basándose en el examen de una sección de la médula oblongada tomada a nivel del obex, considerada como el sitio predilecto donde ocurren los cambios morfológicos [27]. Estos se corresponden con los de una encefalopatía espongiiforme comprendiendo principalmente vacuolización del pericarion neuronal y neurópila formado por las terminaciones axones, dendritas y de las provenientes de las células gliales acompañada por una variable y generalmente menos conspicua gliosis. Las lesiones tienen distribución simétrica bilateral. Las lesiones aparecen generalmente en el tallo cerebral y frecuentemente afectan a los núcleos del tracto solitario y al núcleo dorsal del nervio vago. El examen histológico de secciones de la médula oblongada a nivel del obex puede ser suficiente para confirmar el diagnóstico en casos sospechosos de *Scrapie/EEB* [27].

La patología del *Scrapie* atípico/Nor98 muestra poca o nula vacuolización en el obex y ninguna acumulación de PrP^{Sc} detectada por IHQ, mostrando, en cambio, vacuolización y acumulación de proteína priónica

infectiva en el cerebelo [38].

Es importante explicar que los casos atípicos de EEB también tienen un comportamiento particular en relación a la ubicación de las lesiones propias de cada caso.

3.2 Diagnóstico Inmunoquímico

La evaluación inmunoquímica, que incluye las técnicas de IHC y WB de la médula, incrementa la eficiencia del diagnóstico, ya que la detección de PrP^{Sc} precede a la vacuolización y a los signos clínicos [39]. Este enfoque también permite la caracterización de la proteína priónica que está presente y contribuye a la discriminación de los fenotipos de la enfermedad, particularmente entre Scrapie clásico y atípico, e incluso entre EEB clásico y sus casos atípicos.

3.3 Métodos Inmunoquímicos

Los métodos inmunoquímicos se basan en la detección de PrP^{Sc} con el uso de distintos anticuerpos monoclonales y policlonales en el contexto del tejido nervioso infectado. Estos anticuerpos están dirigidos y se unen a diferentes epitopes de la proteína priónica. Un panel estándar de anticuerpos anti-PrP está dirigido contra los 4 grupos de epitopes que presenta la molécula priónica (epitopes downstream y upstream de la región N-terminal, epitopes del dominio globular, epitopes C-terminal). De esta manera los patrones de inmunoreactividad del panel de anticuerpos para PrP, van a dar la base para la diferenciación entre las EETs en ovinos [36]. Son métodos que permiten no solo detectar la presencia de PrP^{Sc} sino también en la mayoría de los casos visualizar las alteraciones morfológicas específicas de la enfermedad por lo cual constituye una metodología de diagnóstico de elección para los programas de vigilancia y el diagnóstico de confirmación que muchos laboratorios han incorporado. La detección de acumulaciones de PrP^{Sc} mediante IHC tiene una sensibilidad cercana a la del WB para la detección de PrP^{Sc}[27].

3.4 Métodos de Western Blot (WB)

El diagnóstico basado en la detección de PrP^{Sc} por WB requiere que se encuentren presentes solamente las bandas correspondientes a proteínas de masa molecular 27-30 kDa en muestras tratadas con proteinasa K y que éstas sean comparables a las de los controles [27]. En el caso de aislamientos de *Scrapie* atípico/Nor98, estos muestran, después del tratamiento con proteinasa K, un patrón de bandas múltiples distintivo, con una banda de alrededor de 11-12 kDa o 7-8 kDa, las cuales son observadas en los perfiles de WB independientemente de la región del cerebro (particularmente obex, médula oblongada y cerebelo) [40]. Las bases moleculares para esta glicosilación diferencial entre las cepas de EETs no están claras,

siendo los mecanismos fundamentales y su relación con las características de la enfermedad todavía desconocidos [41]

Actualmente existen métodos comerciales rápidos, aprobados por la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE), para la detección de PrP^{Sc} en el diagnóstico de EEB y Scrapie. Estos pueden emplear las técnicas de WB o de ELISA. En el caso de los WB, los distintos fenotipos moleculares de las EETs, basados en los diferentes patrones de glicosilación obtenidos, son usados para la discriminación entre Scrapie clásico, atípico y EEB clásico y atípico [36].

IV. PROGRAMAS DE VIGILANCIA

A partir de la aparición de la enfermedad de la vaca loca, tanto esta (EEB) como el *Scrapie* cobraron suma importancia debido a las grandes pérdidas sufridas. Como consecuencia, muchos países comenzaron a desarrollar estudios de riesgo y programas de vigilancia activa para establecer su situación respecto a las EETs, tanto animales como humanas.

En un principio, la Unión Europea (UE) estableció 4 categorías para clasificar a los países según el riesgo geográfico de EEB (GBR):

Nivel I: Altamente improbable

Nivel II: Improbable pero no excluido

Nivel III: Probable pero no confirmado o confirmado a bajo nivel

Nivel IV: Confirmado a alto nivel

Sin embargo, actualmente el GBR ha dejado de utilizarse, habiendo establecido la OIE una nueva categorización:

I: Riesgo insignificante

II: Riesgo controlado

III: Riesgo indeterminado

Para poder ser categorizado, cada país debe realizar algún tipo de vigilancia a fin de acceder a una cantidad de puntos necesarios según sea la categoría además de contemplar los diferentes criterios establecidos en el artículo 11.4.2 del *Código sanitario para los animales terrestres 2014* (Código Terrestre OIE). En la vigilancia de tipo A, se busca detectar al menos un caso de EEB si la prevalencia es mayor a 1 caso en 100.000, debiéndose alcanzar 300.000 puntos en 7 años; mientras que en la vigilancia de tipo B, se busca detectar al menos un caso de EEB si la prevalencia es mayor a 1 caso en 50.000, debiéndose sumar 150.000 puntos, en ambos casos con un nivel de confianza del 95%. El puntaje total se obtiene de la suma de puntos aportado por cada muestra (animal), la cual varía según las subpoblaciones y los grupos de edad; para que el puntaje sea válido, deben muestrearse todas las categorías o al menos tres de las subpoblaciones de

muestreo. En el caso de Ecuador el tipo de vigilancia que se aplica es el tipo A.

El País Miembro que desee ser reconocido oficialmente en su estatus de la enfermedad por parte de la OIE deberá presentar el cuestionario que figura en la página web de este organismo

(www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/procedimientos-y-politicas-oficiales/)

y responder el cuestionario

(www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/estatus-sanitario-oficial/eeb/)

con la información exigida en el *Código sanitario para los animales terrestre artículo 1.6.5*, así como cumplir con todos los requisitos especificados en el *Código Sanitario para los Animales Terrestre* en materia de EEB. En nombre de la Asamblea, la Comisión Científica para las enfermedades animales (Comisión Científica) de la OIE es responsable de evaluar si las solicitudes de los Países Miembros cumplen con las normas establecidas por la Organización. La evaluación llevada a cabo por la Comisión Científica se basa en las recomendaciones formuladas por el Grupo *ad hoc* conformado por especialistas mundiales en el control de EEB.

Dado que el estatus sanitario oficial de EEB de un país o zona se determina a partir de una evaluación general del riesgo, la aparición de un nuevo foco de EEB implicará una reevaluación del estatus oficial, sólo en el caso de un cambio en la situación epidemiológica que indique fallas en las medidas de mitigación del riesgo aplicadas en la zona o país.

Si la Comisión Científica determina que las condiciones del país han cambiado y ya no cumplen los requisitos del *Código Terrestre*, se puede suspender el estatus sanitario. La Comisión Científica puede decidir la restitución del estatus suspendido si el País Miembro presenta una nueva solicitud y demuestra que cumple con todos los requisitos para la recuperación del estatus sanitario oficial, consignados en los capítulos correspondientes del *Código Terrestre*. Tras una consulta con la Comisión Científica, el Director General de la OIE comunica la suspensión y la restitución del estatus sanitario y la lista de las suspensiones y restituciones se mantiene actualizada hasta que la Asamblea adopte una nueva resolución en el siguiente mes de mayo.

Los Países Miembros que tienen el estatus sanitario de riesgo insignificante de enfermedad, oficialmente reconocido por la OIE, deben presentar cada año un formulario de reconfirmación.

V. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La limitada información acerca de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB, o BSE en inglés) en el Ecuador justifica plenamente la realización actual del correspondiente monitoreo en la población de bovinos y ovinos en las diversas zonas de influencia, relacionada principalmente con aspectos de alimentos para la nutrición de ganado y factores indirectos que afectan a la importación y exportación de animales vivos y productos de origen bovino, todo esto dentro del marco del Programa Nacional de Vigilancia y Prevención de la EEB del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, a través de AGROCALIDAD. El Ecuador se plantea actualmente como objetivo general establecer un programa de prevención y vigilancia de la EEB, mejorando la sanidad y producción del sector ganadero, asegurando su calidad y competitividad tanto nacional como internacional siguiendo las normativas establecidas por la OIE [26], siendo sus objetivos específicos:

- Estructurar una unidad técnica que permita ejecutar de manera eficiente las actividades del programa y trabajar coordinadamente con organismos gubernamentales y asociaciones de ganaderos.
- Controlar las materias primas de riesgo de introducción y diseminación de priones, así como de su caracterización.
- Establecer la vigilancia pasiva y activa para las EETs y diagnóstico para la enfermedad a nivel de confirmación.
- Implementar un control de desechos de riesgo.
- Implementar una estrategia de comunicación y capacitación.

La consecución del estatus I (riesgo insignificante) en relación a la presencia de EEB en el Ecuador, abrirá definitivamente las puertas a la exportación de productos de origen bovino, toda vez que el principal impedimento para dichas exportaciones, el logro del estatus de país libre de fiebre aftosa, ya ha sido alcanzado. De esta manera, Agrocalidad/Ecuador contribuye significativamente al impulso del cambio de la matriz productiva en el país.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero y logístico por parte de las Direcciones de Servicios de Laboratorios y de Sanidad Animal de AGROCALIDAD, así como del Proyecto Prometeo / SENESCYT, Ecuador.

Referencias

- [1] H.G. Creutzfeldt, (1920)“Über eine eigenartige herdformige Erkrankung des Zentralnervensystems”. Z.

- Gesamte Neurol Psychiatrie* 57: 1-18.
- [2] A. Jakob, (1921). "Über eignartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudoskleros Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)". *Z. Gesamte Neurol Psychiatrie* 64: 147-228.
- [3] I. Klatzo; D.C. Gajdusek and V. Zigas, (1959). "Pathology of kuru". *Lab Invest* 8: 799-847.
- [4] R. G. Will, J. W. Ironside, M. Zeidler, S.N. Cousens, K. Estibeiro, S. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiarri, A. Hofman, P.G. Smith, (1996). "A new variant of Creutzfeld-Jakob disease in the UK". *Lancet* 347: 921-925.
- [5] R. Chongsuk,(2007). "Prions and Prion Diseases: Fundamentals and Mechanistic Details". *J Microbiol Biotechnol* 17: 1059-1070.
- [6] GAH Wells and JW Wilesmith(2004). "Bovine spongiform encephalopathy and related diseases", pp 595-628. In S.B. Prusiner (ed.), *Prion Biology and Diseases*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [7] SB Prusiner, (1982). "Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie". *Science* 216:136-144.
- [8] A Asante, M Smidak, A Grimshaw, R Houghton, A Tomlinson, A Jeelani, T Jakubcova, S Hamdan, A Richard-Londt, JM Linehan, S Brandner, M Alpers, J Whitfield, S Mead, JDF Wadsworth, J Collinge (2015) A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. *Nature* 522:478-481
- [9] NA Mabbott (2015) Prospects for safe and effective vaccines against prion diseases. *Expert Rev Vaccines* 14:1-4
- [10] A Trovato, S Panelli, F Strozzi, C Cambulli, I Barbieri, N Martinelli, G Lombardi, R Capoferri, JL Williams (2015) Expression of genes involved in the T cell signalling pathway in circulating immune cells of cattle 24 months following oral challenge with Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy (BASE). *BMC Vet Res* 11:105
- [11] PJ Skinner, HO Kim, D Bryant, NJ Kinzel, C Reilly, SA Priola, AE Ward, PA Goodman, K Olson, DM Seelig (2015) Treatment of Prion Disease with Heterologous Prion Proteins. *PLoS One* 10:e0131993
- [12] NJ Cobb and WK Surewicz.(2009). "Prion Diseases and Their Biochemical Mechanisms". *Biochemistry* 48: 2574-2585.
- [13] MG Doherr, (2007). "Brief review on the epidemiology of transmissible spongiform encephalopathies (TSE)". *Vaccine* 25: 5619 – 5624.
- [14] M Scott, D Peretz, RM Ridley, HF Baker, SJ DeArmond, SB Prusiner. (2004). "Transgenic investigations of the species barrier and prion strains", pp.435-482. In S.B. Prusiner (ed), *Prion Biology and Diseases*, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- [15] V Béringue, J-L Vilotte, H Laude. (2008). "Prion agent diversity and species barrier". *Vet Res* 39:47.
- [16] H Okada, K Masujin, K Miyazawa, T Yokoyama (2015) Acquired transmissibility of sheep-passaged L-type bovine spongiform encephalopathy prion to wild-type mice. *Vet Res* 46:81
- [17] T Konold, R Nonno, J Spiropoulos, MJ Chaplin, MJ Stack, SAC Hawkins, S Cawthraw, JW Wilesmith, GAH Wells, U Agrimi, MA Di Bari, O Andréoletti, JC Espinosa, P Aguilar-Calvo, JM Torres (2015) Further characterization of transmissible spongiform encephalopathy phenotypes after inoculation of cattle with two temporally separated sources of sheep scrapie from Great Britain. *BMC Res Notes* 8:312
- [18] KA Davenport, DM Henderson, CK Mathiason, EA Hoover (2015) Insights into CWD and BSE species barriers using real-time conversion. *J Virol* (pii: JVI.01439-15. publicación electrónica antes de impresión)
- [19] SF Godsave, PJ Peters, H Wille (2015) Subcellular distribution of the prion protein in sickness and in health. *Virus Res* (2015.02.004 publicación electrónica antes de impresión)
- [20] E Holznagel, B Yutzy, C Kruip, P Bierke, W Schulz-Schaeffer, J Löwer (2015) Foodborne-Transmitted Prions From the Brain of Cows With Bovine Spongiform Encephalopathy Ascend in Afferent Neurons to the Simian Central Nervous System and Spread to Tonsils and Spleen at a Late Stage of the Incubation Period. *J Infect Dis* (publicación electrónica antes de impresión)
- [21] DM Henderson, KA Davenport, NJ Haley, ND Denkers, CK Mathiason, EA Hoover (2015) Quantitative assessment of prion infectivity in tissues and body fluids by real-time quaking-induced conversion. *J Gen Virol* 96:210-219
- [22] SB Prusiner. (1991). "Molecular biology of prion diseases". *Science* 216: 136-144.
- [23] J Priem, JPM Langeveld, LJM van Keulen, FG van Zijderveld, O Andreoletti, A Bossers (2014) Enhanced virulence of sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent is revealed by decreased polymorphism barriers in prion protein conversion studies. *J Virol* 88:2903-2912
- [24] GAH Wells, AC Scott, CT Johnson, RF Gunning, RD Hancock, M Jeffrey, M Dawson, R Bradley. (1987). "A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle". *Vet Rec* 121: 419-420.
- [25] C Ducrot, M Arnold, A de Koeijer, D Heim, D Calavas. (2008). "Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics". *Vet Res* 39: 15.
- [26] OIE Código sanitario para los animales terrestres 2014. Capítulo. – Encefalopatía Espongiforme Bovina, Capítulo. – Scrapie.

www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/acceso-en-linea/

- [27] Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 7ª edición 2012 Volumen 1 Parte 2 CAPÍTULO 2.4.6. ISBN 978-92-9044-884-6
- [28] AG Biacabe, JL Laplanche; S Ryder; T Baron. (2004) Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5:110-114
- [29] C Casalone; G Zamuso, P Acutis P. et al (2004) Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3065-3070
- [30] M Eloit, K Adjou, M Couplier, JJ Fontaine, R Hamel, T Lilin, S Messiaen, O Androletti, T Baron, A Bencsik, AG Biacabe, V Beringue, H Laude, A Le Dur, JL Vilotte, E Comoy, JP Deslys, J Grassi, S Simon, F Lantier, P Sarradin (2005). "BSE agent signatures in a goat." *Vet Rec.* 2005 Apr 16;156(16):523-4.
- [31] M Jeffrey, S Martin, L González, J Foster, JP Langeveld, FG van Zijderveld, J Grassi, N Hunter (2006) "Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies." *J Comp Pathol.* 2006 Feb-Apr; 134(2-3):171-81.
- [32] M Eloit, K Adjou, M Couplier, JJ Fontaine, R Hamel, T Lilin et al. (2005). « BSE agent signatures in a goat". *Vet Rec* 156: 523-524.
- [33] O'Rourke K.I., Bazler T.V., Besser T.E. et al. 2000 Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J. Clin Microbiol* 38:3254-3259
- [34] JC Watts, A Balachandran, D Westaway. (2006). "The expanding universe of prion diseases". *Plos Pathog* 2: 26.
- [35] F Kubler, B Oesch, A Raeber. (2003). "Diagnosis of prion diseases". *Br Med Bull* 66: 267-279.
- [36] M Jeffrey and L González. (2007). "Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease". *Neuropathol Appl Neurobiol* 33: 373-394.
- [37] Y Murayama, K Masujin, M Imamura, F Ono, H Shibata, M Tobiume, T Yamamura, N Shimozaki, K Terao, Y Yamakawa, T Sata (2014). Ultrasensitive detection of PrP(Sc) in the cerebrospinal fluid and blood of macaques infected with bovine spongiform encephalopathy prion. *J Gen Virol* 95:2576–2588
- [38] N Hunter. (2007). "Scrapie – Uncertainties, biology and molecular approaches". *Biochim Biophys Acta* 1772: 619-628.
- [39] AN Hamir, JM Miller, MJ Schmerr, MJ Stack, MJ Chaplin, RC Cutlip. (2001). "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.
- [40] H B Parry, (1962). "Scrapie: A Transmissible and Heredity Disease Of Sheep". *Heredity*, 17: 75-105
- [41] SL Benestad, P Sarradin, B Thu, J Schönheit, MA Tranulis, B Bratberg. (2003). "Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98". *Vet Rec* 153: 202-208.
- [42] John Wilesmith, (1988)"Bovine spongiform encephalopathy". *Vet Rec.*;122(25):614.
- [43] JK Kirkwood, AA Cunningham. (1994)"Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles". *Vet Rec.* 135(13):296-303.
- [44] JM Wyatt, GR Pearson, TN Smerdon, TJ Gruffydd-Jones, GA Wells, JW Wilesmith. (1991)"Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats". *Vet Rec.*;129(11):233-6.
- [45] GR Hartsough, D Burger.(1965)"Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations".*J Infect Dis.*;115(4):387-92
- [46] ES Williams, S Young. (1982)"Spongiform encephalopathy of Rocky Mountain elk". *J Wildl Dis.*18(4):465-71.
- [47] DC Gajdusek and V Zigas. (1957)"Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population".*N Engl J Med.*;257(20):974-8
- [48] AF Hill, M Desbruslais, S Joiner, KC Sidle, I Gowland, J Collinge, LJ Doey, P Lantos. (1997)"The same prion strain causes vCJD and BSE." *Nature.*389(6650):448-50
- [49] J Collinge, KC Sidle, J Meads, J Ironside, AF Hill. (1996)"Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD". *Nature.* 383(6602):685-90.
- [50] J Gerstmann, E Sträussler, I Scheinker. (1936)"Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zetralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns". *Z. ges. Neurol Psychiat*; 154:736–762
- [51] E Lugaresi, R Medori, P Montagna, A Baruzzi, P Cortelli, A Lugaresi, P Tinuper, M Zucconi, P Gambetti. (1986)"Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei". *N Engl J Med*, 315:997-1003