

Rocío Sarasa Orcástegui

Caracterización molecular y
fenotípica del agente causal en
casos no concluyentes de
Encefalopatías espongiiformes
transmisibles animales

Departamento
Patología Animal

Director/es

Monzón Garcés, Marta
Badiola Díez, Juan José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA
DEL AGENTE CAUSAL EN CASOS NO
CONCLUYENTES DE ENCEFALOPATÍAS
ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES ANIMALES

Autor

Rocío Sarasa Orcástegui

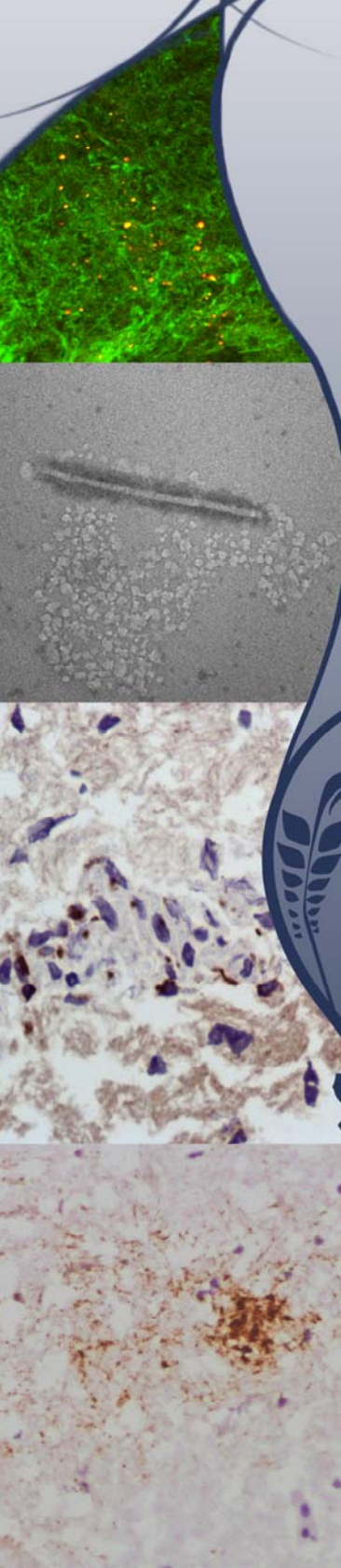
Director/es

Monzón Garcés, Marta
Badiola Díez, Juan José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Patología Animal

2012



Caracterización molecular
y fenotípica del agente
causal en casos no
concluyentes de
Encefalopatías
Espongiformes
Transmisibles
animales

ROCIO SARASA ORCASTEGUI

Departamento de Patología Animal
Zaragoza 2012

DEPARTAMENTO PATOLOGÍA ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FENOTÍPICA DEL
AGENTE CAUSAL EN CASOS NO CONCLUYENTES DE
ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES
ANIMALES**

MEMORIA PRESENTADA POR:

ROCÍO SARASA ORCASTEGUI

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA POR
LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DIRIGIDA POR:

**DRA. MARTA MONZÓN GARCÉS
DR. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**

ZARAGOZA, 2012

ÍNDICE

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| OBJETIVOS..... | 3 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 5 |
| 1. Encefalopatías espongiformes transmisibles | 5 |
| 2. Encefalopatía espongiforme bovina | 9 |
| 3. Diagnóstico de la encefalopatía espongiforme bovina | 17 |
| 3.1. Utilidad de la proteína prión celular y patológica..... | 17 |
| 4. Técnicas diagnósticas | 20 |
| 4.1. Histología..... | 25 |
| 4.2. Inmunohistoquímica | 26 |
| 4.3. <i>Western blot</i> | 28 |
| 4.4. Microscopía electrónica | 31 |
| 4.5. Inoculación en modelo murino..... | 35 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 41 |
| 1. Técnica rápida..... | 41 |
| 1.1. <i>Prionics®-Check WESTERN test</i> | 41 |
| 2. Inmunohistoquímica..... | 43 |
| 3. <i>Western blot</i> | 44 |
| 3.1. <i>Western blot</i> de diferenciación de Bio-Rad (Ref.: 35 51177). | 47 |
| 4. Microscopía electrónica | 49 |
| 5. Bioensayo en ratón | 50 |
| 5.1. Pruebas preliminares..... | 51 |
| 5.1.1. Contaminación microbiana..... | 51 |
| 5.1.2. Toxicidad. | 52 |
| 5.2. Inoculación en ratón..... | 52 |
| 5.3. Inmunohistoquímica | 55 |
| 5.4. Inmunohistoquímica ultrasensible..... | 56 |
| 5.5. Detección de SAF por microscopía electrónica y marcaje con oro coloidal.. | 57 |
| | 57 |
| 5.6. Microscopía confocal..... | 57 |
| RESULTADOS | 59 |
| 1. Técnica rápida..... | 59 |
| 2. Técnicas de confirmación en las muestras autolíticas bovinas:..... | 59 |
| 2.1. Inmunohistoquímica | 59 |
| 2.2. <i>Western blot</i> de confirmación (OIE) | 61 |
| 2.2.1. <i>Western blot</i> de diferenciación de Bio-Rad (Ref.: 35 51177) | 62 |
| 2.3. Microscopía electrónica | 63 |
| 3. Bioensayo en ratón | 65 |
| 3.1. Pruebas preliminares..... | 65 |
| 3.1.1. Contaminación microbiana..... | 65 |
| 3.1.2. Toxicidad | 66 |
| 3.2. Inoculación experimental | 68 |
| 3.3. Técnicas rápidas de diagnóstico en muestras murinas..... | 71 |
| 3.4. Técnicas de confirmación en las muestras murinas | 73 |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| DISCUSIÓN | 87 |
| CONCLUSIONES | 115 |
| CONCLUSIONS | 117 |
| RESUMEN | 119 |
| SUMMARY | 126 |
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 129 |
| INDEX OF FIGURES AND TABLES | 133 |
| BIBLIOGRAFÍA | 137 |

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) es, al igual que el resto de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), una enfermedad crónica caracterizada por producir una neurodegeneración que acaba siendo siempre mortal en el ganado bovino. El periodo de incubación es prolongado y la sintomatología de los animales enfermos se caracteriza por cambios del comportamiento y alteraciones nerviosas. Una característica singular es su capacidad de transmitirse a otras especies, incluida la humana, en la que produce la enfermedad denominada variante de Creutzfeldt-Jakob. El único agente causal conocido hasta el momento es el prión, una isoforma patológica de una proteína celular presente en el tejido nervioso de todos los individuos que altera su estructura tridimensional y se convierte en patológica con características bioquímicas propias. La detección de la proteína prión patológica (PrP^{sc}) confirma la enfermedad y es la base de todas las técnicas diagnósticas que se utilizan para su diagnóstico laboratorial.

Dichas técnicas han demostrado ser válidas para el diagnóstico de la enfermedad, por lo que han sido aceptadas tanto por la OIE (*Office International des Epizooties*) como por la Comisión Europea y por ello utilizadas en los programas de vigilancia y control de la enfermedad. No obstante, en algunas ocasiones pueden proporcionar resultados no definitivos, de manera que no es posible confirmar la enfermedad ni descartarla. Estos resultados pueden atribuirse a diversas causas.

Este trabajo pretende investigar determinadas muestras que proporcionaron un resultado diagnóstico no concluyente mediante las técnicas convencionales, llevando a cabo una valoración comparativa de estas técnicas de confirmación actualmente establecidas para el diagnóstico de la EEB. El objetivo es comparar la eficacia de cada una de las técnicas diagnósticas utilizadas sobre este tipo de muestras y determinar la influencia que pueden tener factores como la autólisis o

la baja concentración de PrPsc en todas ellas. Con este estudio, en definitiva, se pretende llevar a cabo una estimación precisa de la validez de estas técnicas sobre determinadas muestras en el diagnóstico de una enfermedad que tiene una gran importancia desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, por su demostrado carácter transmisible a los humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Realización de un análisis comparativo sobre la eficacia de todas las técnicas de confirmación establecidas por la OIE para el diagnóstico de la EEB en muestras que han presentado un resultado no concluyente, mediante la aplicación de las técnicas convencionales.
- Adaptación y estandarización de las técnicas de confirmación existentes para su aplicación en muestras de similares características a las analizadas en este estudio.
- Estudio de las posibles causas que influyen en el diagnóstico de las muestras analizadas para obtener resultados no concluyentes, prestando especial interés al estado autolítico y a la baja concentración de PrPsc en ellas.
- Confirmación, mediante la utilización de un modelo *in vivo*, de la fiabilidad de los resultados obtenidos a través de la técnica de inmunocitoquímica en frotis para muestras con muy avanzado grado de autólisis.
- Valoración de la existencia de un nuevo agente causal como posible origen de los resultados obtenidos a partir de estas muestras con las técnicas establecidas para ello a través de la evidencia de una variabilidad fenotípica.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Encefalopatías espongiformes transmisibles (EET)

Las EET son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a los animales como al hombre, provocando la muerte inevitablemente tras un largo periodo de incubación por una degeneración progresiva del sistema nervioso central. El agente causal es el prión, una proteína celular presente en estado fisiológico que, al sufrir un cambio conformacional, se convierte en patológica. Las vías posibles de transmisión son: hereditaria, adquirida y esporádica, aunque en las EET animales se contempla sólo la forma adquirida. Esta forma parece llevarse a cabo mediante la ingestión, ya que los priones han sido detectados en el tracto intestinal (concretamente en las placas de Peyer; Bergström *et al.*, 2006), aunque no se conoce la vía por la que alcanzan el sistema nervioso central, ni la manera por la cual llegan a invadir todas las áreas del encéfalo.

Aunque el Scrapie se conoce desde hace más de 250 años, la existencia de este tipo de enfermedades cobró relevancia con la primera descripción del kuru, enfermedad neurodegenerativa aparecida en Nueva Guinea que afectaba al hombre hasta causarle la muerte (Alpers y Rail, 1971) y que se asoció a la práctica del canibalismo en los ritos funerarios mediante la ingestión del encéfalo de las personas fallecidas. En el hombre han sido descritas la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ; Beck *et al.*, 1969a), enfermedad de Gertsman-Straussler-Scheinker (Bendheim, 1984a; Collinge *et al.*, 1989) y el insomnio familiar fatal (Manetto *et al.*, 1992; Medori *et al.*, 1992), además de la variante de ECJ (vECJ; Hill *et al.*, 1997) relacionada con la EEB. También afectan a varias especies animales, siendo de gran importancia la EEB (Hope *et al.*, 1989), el Scrapie en ganado ovino y caprino (Gordon, 1966), la enfermedad caquetizante de los ciervos (CWD; Williams y Young, 1980) y la encefalopatía transmisible del visón (ETV; Zlotnik y Barlow, 1967).

La idea más aceptada sobre el origen de la enfermedad es la denominada teoría de la proteína única (Alper *et al.*, 1967), que constituye el único agente patógeno conocido (Prusiner, 1991) y adopta el nombre de prión (Prusiner *et al.*, 1982). Esta teoría asocia el comienzo de la enfermedad a un cambio en la estructura terciaria de la proteína prión normal (PrP^c), que sufre un cambio conformacional que la transforma en una proteína prión patológica (PrP^{sc}), con características diferentes.

Respecto a la proteína celular (PrP^c), se conoce que es una sialoglicoproteína de membrana sintetizada en el sistema nervioso (Fournier *et al.*, 1998) y que está constituida por una copia simple, pequeña y situada en el gen del cromosoma 20, expresada preferentemente en las neuronas (Kretzschmar *et al.*, 1986). Está codificada por el gen PRNP y se encuentra vinculada a un *locus* que controla el tiempo de incubación (Carlson *et al.*, 1986; Prusiner *et al.*, 1998a). Está presente en la mayoría, si no en todos, los mamíferos, ya que está altamente conservada en las especies (Díaz-San Segundo *et al.*, 2006). Así, se ha encontrado en el ovino, bovino, hámster, ratón, visón y en seres humanos, con un 80-90% de homología entre las secuencias de dicha proteína en las diferentes especies. Su función es hasta ahora desconocida, aunque según diversos estudios, parece que se relaciona con el metabolismo del cobre (Brown *et al.*, 1997) y la transmisión neuronal (Collinge *et al.*, 1994), principalmente con vesículas presinápticas (Fournier *et al.*, 1995). Así, en ratones en los que se ha eliminado dicha proteína, se observan diversas alteraciones tales como activación de linfocitos, neurotransmisión alterada, perturbación de ritmos circadianos, pérdida de las células de Purkinje y alteraciones en la actividad de la superóxido dismutasa (SOD-1; Westaway *et al.*, 1998). Además, parece ser la responsable de los cambios neuropatológicos encontrados en las enfermedades priónicas, ya que la enfermedad parece estar asociada a un aumento de toxicidad por la acumulación de formas PrP^{sc} o a la pérdida de la función normal de PrP^c por su eliminación o interferencia con la PrP^c (Jeffrey *et al.*, 2010). Lo que se sabe con certeza es que el tiempo de incubación o la diferente susceptibilidad del animal afectado es

inversamente proporcional a la cantidad de PrPc expresada (Prusiner, 1996).

Por su parte, la PrPsc está codificada por el mismo gen (Basler *et al.*, 1986) y constituida por la misma secuencia de aminoácidos que la PrPc (Stahl *et al.*, 1993). Tiene un peso molecular de 33-35 kDa y presenta distintas características físicas y químicas respecto a la PrPc (González *et al.*, 2003), como una movilidad electroforética y un perfil de la glicofoma distintos y una resistencia parcial a las proteinasas. La transformación de PrPc a PrPsc consiste en un cambio conformacional (Pan *et al.*, 1993) y se realiza por un mecanismo de post-traslación (Borchelt *et al.*, 1990; Caughey y Raymond 1991). Todo el proceso parece ocurrir en la membrana plasmática o en la vía endocítica hacia los lisosomas, con el objetivo de almacenarse en los lisosomas secundarios (Caughey y Chesebro, 1997). Concretamente, esta transformación se basa en que, mientras que la PrPc muestra una alta presencia de α hélice y bajo contenido de β plegada en su estructura (Collins *et al.*, 2004), tras este cambio, se observa un alto porcentaje de estructura β y disminución de la estructura α (Pan *et al.*, 1993; Prusiner, 1996), lo que confiere a la PrPsc una patogenicidad elevada (Meyer *et al.*, 1986). Concretamente, la PrPsc tiene un contenido de estructura β plegada del 43 % y de α hélice de un 30%, en relación con la PrPc que contiene un 3% y 42%, respectivamente (Prusiner, 1996). Este incremento de la estructura β de la proteína patológica (Nguyen *et al.*, 1995; Legname *et al.*, 2004; Novakofski *et al.*, 2005) es lo que produce una polimerización e insolubilidad de la proteína (Meyer *et al.*, 1986) y una desaparición de algunos epítomos de superficie (Peretz *et al.*, 1997; Wille *et al.*, 2002) que le confiere sus nuevas características. Así, las principales diferencias de la PrPsc con respecto a la PrPc son la resistencia parcial a la proteinasa K (Taraboulos *et al.*, 1990; Parchi *et al.*, 2000) y la insolubilidad (Cordier *et al.*, 2006). Además, su depósito en el sistema nervioso central de los animales afectados, junto a la vacuolización del neuropilo, que tiene como resultado la aparición de espongiosis, es lo más característico de este grupo de enfermedades, que también se suelen acompañar de otras alteraciones como gliosis y muerte de neuronas (pérdida neuronal), aunque nunca de lesiones

inflamatorias (Fraser, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 2009).

La acumulación de la PrPsc precede a la patología y hay una relación consistente entre dicha proteína y los cambios patológicos. Se sabe que la PrPsc causa los cambios neurodegenerativos, lo que conlleva posteriormente la enfermedad clínica (Jeffrey *et al.*, 2010), y que es responsable directa de la activación de los astrocitos (Lasmézas *et al.*, 1996). Puesto que la PrPsc es el único componente del agente causal, su detección es considerada como un marcador específico de la misma (Bolton *et al.*, 1982).

Desde el punto de vista clínico, este grupo de enfermedades presenta unos síntomas variados, siendo los más comunes: trastornos en la conducta, demencia, descoordinación visual-espacial y ataxia cerebelar, aumentando la relevancia de algunos de ellos según las especies afectadas. Por ejemplo, mientras que la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob se presenta como demencia progresiva, en el caso del Scrapie y de la EEB, la enfermedad, en general, se manifiesta principalmente con ataxia (Wells *et al.*, 1987; Prusiner *et al.*, 1998a).

El diagnóstico de la enfermedad es complicado pues, a pesar de la sospecha clínica, no existe un método que permita su diagnóstico *in vivo* (Kimberlin, 1993), exceptuando la biopsia de tejido linfoide en ciertas especies animales que, aunque es totalmente específica, no presenta un 100% de sensibilidad. Ésta es una de las razones, junto a la ausencia de tratamiento y al desenlace siempre fatal de la enfermedad, del creciente interés que ha tenido el estudio de este grupo de enfermedades. Dentro de todas ellas, el presente trabajo se centra en la EEB, enfermedad que afecta al ganado bovino y que posee las mismas características de todas las EET, entre las que destaca su capacidad zoonótica. La demostración de la asociación del origen de la vECJ con la EEB, junto con la descripción de un caso de EEB en cabra (Eurosurveillance, 2005), con la consiguiente preocupación porque la EEB pudiera estar enmascarada por el Scrapie en el ganado ovino y caprino, justifica el interés de la búsqueda de un buen diagnóstico de la EEB,

avalando la importancia de los avances que puede aportar este trabajo en el estudio de estas enfermedades.

2. Encefalopatía espongiforme bovina (EEB)

La EEB fue detectada por primera vez en Reino Unido en 1986 (Wells *et al.*, 1987). La forma de aparición y posterior desarrollo de la enfermedad se relacionó con un patrón clásico de una fuente común epidémica, es decir, brotes simultáneos por la exposición a un agente causal común en un mismo periodo, más que a una epidemia progresiva debida a la transmisión directa o indirecta del agente de un hospedador a otro (Nathanson *et al.*, 1997). Aun así, el origen de la enfermedad no se conoce bien y, de hecho, se trata de una cuestión controvertida (Baron *et al.*, 2006). A pesar de que la hipótesis más aceptada se basó en el consumo de piensos contaminados con la proteína prión, se valoraron otras posibilidades. Entre otras, que la enfermedad provenía de una adaptación del agente del Scrapie al ganado vacuno (Biacabe *et al.*, 2004) o que se trataba de una forma rara, esporádica y espontánea de la enfermedad, como ocurría en los humanos. De todas las posibilidades, la más aceptada, la de la contaminación de los piensos con proteína animal, se basaba, según los estudios epidemiológicos, en la coincidencia en el tiempo de la mayor incidencia de la enfermedad con un cambio en el sistema de fabricación de los piensos. Un suplemento proteico en la dieta usada en los animales tras el destete (Nathanson *et al.*, 1997), que comenzó entre 1981-1982, pudo provocar una posible presencia del agente del Scrapie en las harinas de carne y hueso que componían estos piensos comerciales (Wells *et al.*, 1991). Aunque nunca fue demostrada esta hipótesis como la causa definitiva del problema, sí se comprobó estadísticamente que era un factor de riesgo para la aparición de la EEB (Wilesmith *et al.*, 1992a). Respecto a las razones que se barajaron para explicar la aparición y mayor incidencia en el Reino Unido de los casos de EEB, se consideraron varias circunstancias, como el alto número de ganado ovino, la alta prevalencia del Scrapie, el sistema de alimentación intensivo del ganado basado en el uso de harinas de carne y hueso y los cambios

en la preparación del alimento en las plantas de transformación (Nathanson *et al.*, 1997).

La EEB, al igual que el resto de las EET, se caracteriza por su condición de enfermedad neurodegenerativa y su carácter crónico, que conlleva un largo periodo de incubación que desemboca en la muerte del animal (Cordier *et al.*, 2006). Como en el resto de enfermedades pertenecientes a este grupo, destaca el característico aspecto esponjiforme de determinadas áreas del sistema nervioso central (SNC) que acaba afectando a todo el encéfalo (Liberski *et al.*, 1990). En concreto, en el caso de la EEB, el periodo de incubación, aunque puede variar, suele ser de 4 ó 5 años, siendo raramente encontrada en animales de menos de 30 meses (Smith y Bradley, 2003; Saegerman *et al.*, 2005).

En cuanto a las características clínicas de la EEB, éstas han sido bien descritas (Miyashita *et al.*, 2004) y parecen relacionarse principalmente con una pérdida de función del núcleo motor dorsal vagal (Pomfrett *et al.*, 2007). Los síntomas pueden confundirse con los de otros procesos neurodegenerativos (Cockcroft, 2004) y se resumen en una aprehensión progresiva, hiperestesia y descoordinación del paso, con una duración de 1 a 6 meses antes de la muerte. Aun así, estos síntomas no son fijos y puede haber variaciones, dependiendo de las regiones específicas del encéfalo donde se acumula mayoritariamente la PrPsc, el patrón de lesiones característico y la naturaleza de los depósitos proteicos (Novakofski *et al.*, 2005). Entre los síntomas que más comúnmente se presentan están: abatimiento, ausencia de ganancia de peso, pérdida de coordinación, chasqueo de labios, irritabilidad, disminución de la producción de leche (aproximadamente el 50% de los casos), pérdida progresiva de equilibrio, incapacidad de levantarse, aprehensión, hiperestesia, anormalidades en el comportamiento, hiperreactividad, ataxia de la marcha y pérdida de la condición corporal (Winter *et al.*, 1989; Wilesmith *et al.*, 1992b; Konold *et al.*, 2004). Esta variedad de signos clínicos puede ser resumida en diez que, según Saegerman *et al.* (2004), son los más relevantes de la EEB: patadas en la sala de ordeño,

resistencia para entrar en la sala, hipersensibilidad al tacto y / o sonido, nerviosismo, aprehensión o miedo, movimientos anormales de la cabeza, estado de alerta, reducción en el rendimiento de la leche, rechinar de dientes y cambios de comportamiento. La mayoría de estos signos también se observan en los modelos experimentales de la enfermedad tras la inoculación (Lombardi *et al.*, 2008).

Respecto a la diseminación de la PrPsc en la EEB y su llegada al sistema nervioso central, como en el resto de EET, el proceso no está esclarecido. Se conoce que entra por vía oral (Gavier-Widén *et al.*, 2005) debido a la presencia de PrPsc en el íleon de ganado con EEB experimental (Wells *et al.*, 1994a), pero no se conoce cómo se propaga desde ahí hasta el encéfalo, a pesar de todos los estudios llevados a cabo al respecto (Aguzzi *et al.*, 2004; Unterberger *et al.*, 2005). La vía de entrada es importante porque podría ser una de las claves en las que se basa la susceptibilidad individual al agente de la EEB (Fournier *et al.*, 1998), dependiendo del estado fisiológico del tejido digestivo y su capacidad para liberar la PrPc. A partir de ahí, parece que la PrPc es absolutamente necesaria para el transporte del agente patógeno, tanto desde el punto de entrada y los tejidos periféricos al SNC (Blättler *et al.*, 1997) como a través del mismo (Brandner *et al.*, 1996). En el caso concreto de la EEB, parece que este transporte se lleva a cabo a través del sistema nervioso autónomo (Hoffmann *et al.*, 2007), con la principal diferencia respecto al Scrapie del nulo papel del sistema linforreticular en la diseminación de la enfermedad (Somerville *et al.*, 1997), debido a que, en el caso de la enfermedad bovina, los depósitos de PrPsc no son linfotrópicos (Aguzzi *et al.*, 2004).

En cuanto a la transmisión de la enfermedad, todas las EET se caracterizan por la capacidad de transmitirse de una forma eficiente entre hospedadores de las mismas especies de mamíferos, con un periodo de incubación uniforme. Por el contrario, la transmisión de la proteína prión entre animales de distintas especies es ineficaz o requiere de largos periodos de incubación para que sea exitosa. Esta resistencia a la infección, vista en el primer pase de la enfermedad a una nueva

especie, es lo que se denomina la barrera de especie (Moore et al., 2005). Esta es mayor o menor dependiendo de las diferencias entre la secuencia de la proteína del hospedador y el donante (Cordier *et al.*, 2006), concretamente según el grado de heterología de la secuencia aminoacídica de la PrP^{sc} del donante respecto a la PrP^c del hospedador (Chen y Gambetti, 2002). En el caso de la EEB, la transmisión a otras especies viene facilitada por la inexistencia de la barrera de especie que permite el paso de la enfermedad directamente a ratón y hombre (Gavier-Widén *et al.*, 2005) mediante inoculación o ingestión de material contaminado por tejidos afectados (Chesebro, 2003). Por un lado, esta característica resulta imprescindible para la utilización de la inoculación en modelo murino como una técnica diagnóstica efectiva, pero también, gracias a esta transmisibilidad, es por lo que pudo ocurrir el salto de la enfermedad a la especie humana, originando los casos de vECJ descritos posteriormente. Hasta hace poco se pensaba que esta transmisibilidad también la diferenciaba de otros desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad del Alzheimer o Parkinson, pero actualmente se ha demostrado que, en este aspecto, también pueden estar relacionadas. Estas enfermedades, que también están causadas por un aumento tóxico de la función de una forma aberrante de una proteína (Collins *et al.*, 2004), podrían ser también transmisibles, como se ha demostrado en el caso del Alzheimer (Meyer-Luehmann *et al.*, 2006; Eisele *et al.*, 2009).

Microscópicamente las alteraciones más importantes son la vacuolización, pérdida neuronal y gliosis. La lesión histológica más característica es la vacuolización simétrica bilateral de la materia gris del neuropilo (espongiosis) y/o del pericarion neuronal, que tiene preferencia por ciertas localizaciones neuroanatómicas (Gavier-Widén *et al.*, 2005). Esta localización en determinados núcleos específicos se considera una lesión muy específica, aunque también puede observarse como consecuencia de ciertos tipos de tóxicos o enfermedades metabólicas o infecciosas (Jeffrey *et al.*, 2010). La histopatología de la EEB se ha definido con detalle (Wells *et al.*, 1989), aunque pueden existir numerosas variaciones (Jeffrey *et al.*, 1995), siendo no siempre visible y, a veces, muy escasa

en algunos casos naturales de EEB (Jeffrey, 1990). A pesar de que la vacuolización es la alteración más significativa, también se considera relevante la pérdida neuronal (Jeffrey *et al.*, 1995), relacionada con la distrofia neuroaxonal. Este cambio ultraestructural, característico de ésta y otras EET (Liberski *et al.*, 1990; Jeffrey *et al.*, 1992; Jeffrey y Halliday, 1994), aparece de forma notoria y su patrón es similar en todos los casos (Liberski *et al.*, 1990). Por último, en la EEB no sólo se aprecian alteraciones neuronales sino también una hiperplasia y/o alteración morfológica de las células gliales (Vidal *et al.*, 2006), con demostrado aumento de GFAP (*Glial fibrillary acidic protein*; Miyashita *et al.*, 2004), compatible con astrocitosis (Bautista *et al.*, 2006; Gubler *et al.*, 2007).

En relación con el agente causal, desde el principio se creyó en la existencia de una única cepa del agente de la EEB, ya que se encontraban los mismos patrones de vacuolización tanto en casos naturales como experimentales (Wells *et al.*, 1992), incluso en modelos murinos de la enfermedad (Bruce *et al.*, 1994, 1997). Además, la distribución del resto de lesiones neurodegenerativas en el encéfalo era la misma (Simmons *et al.*, 1996), viéndose una lesión uniforme, con un periodo de incubación invariable, independiente del origen del inóculo utilizado y con propiedades bioquímicas y biológicas que permanecían estables, incluso tras la transmisión de la enfermedad a otras especies (Bruce *et al.*, 1994; Cordier *et al.*, 2006). Esta misma caracterización de la EEB había sido descrita en varios estudios como los de Bruce (2003), Baron *et al.*, (2006) y Collinge y Clarke (2007), incluso comparando la patología de los casos de EEB en Gran Bretaña con casos de EEB en otros países europeos (Orge *et al.*, 2000; Casalone *et al.*, 2006). Además, estas características eran idénticas a las encontradas en ratones inoculados con el agente causal de la vECJ humana (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997), confirmando la teoría de que tenían el mismo origen.

Más adelante, probablemente debido a la instauración de la vigilancia activa en 2001 por la que había que analizar todos los animales sacrificados para consumo o muertos en granja, aumentando el número de casos estudiados,

Biacabe *et al.* en Francia y Casalone *et al.* en Italia en 2004 describieron dos fenotipos moleculares diferentes al anteriormente descrito. Posteriormente, estas variantes fueron apareciendo en varios países europeos (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004; Polak *et al.*, 2004; Buschmann 2006; Gavier-Widén *et al.*, 2008), Japón (Yamakawa *et al.*, 2003) y Estados Unidos (Richt *et al.*, 2007; Stack *et al.*, 2009). Estas diferencias, que no habían sido aún descubiertas, revelaban una posible variabilidad del agente causal basándose en cuatro aspectos diferenciales fundamentales tales como los tiempos de incubación, perfiles de cambio esponjiforme (es decir, distribución de vacuolización neuronal y del neuropilo; Fraser y Dickinson, 1968) y de depósito de PrPsc y perfil glicosilado, características evidenciadas en experimentos de inoculación en ratón. La razón de esta variabilidad en el agente causal de la EEB se asocia a la diferente conformación que podría adoptar la proteína, que afecta en mayor o menor medida a la patogenicidad y al grado de adaptación a otras especies (Collinge y Clarke, 2007). Estas múltiples conformaciones que se sintetizan durante la replicación del prión (Prusiner, 1996), también podrían deberse a mutaciones puntuales (Telling *et al.*, 1996) que provocan cambios en el grado de glicosilación de la proteína (Novakofski *et al.*, 2005). Concretamente, dos nuevos tipos han sido identificados, la H-EEB y la L-EEB (Jacobs *et al.*, 2007), diferenciados principalmente por la altura de la banda no glicosilada en la electroforesis, *high* en H-EEB y *low* en la L-EEB (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004). En el caso de la H-EEB, una banda no glicosilada más pesada que la observada en la EEB clásica, la afinidad con el anticuerpo P4 (Stack *et al.*, 2009) y unas características diferentes a las observadas en el caso de la EEB clásica tras la inoculación en modelo murino diferentes a las observadas en el caso de la EEB clásica, caracterizan la cepa. En cambio, la L-EEB se caracteriza por tener una predominancia de la banda monoglicosilada y una banda no glicosilada más ligera que la de EEB clásica en el perfil glicosilado (Masujin *et al.*, 2008), además de presentar placas amiloides en el estudio inmunohistoquímico (Masujin *et al.*, 2008). Esta forma de depósito de PrPsc es lo que hizo que esta cepa sea conocida como BASE (*Bovine Amyloidotic Spongiform Encephalopathy*; Hagiwara *et al.*, 2007).

La distribución de la PrPsc también es diferente con respecto a la de la cepa clásica, con una mayor presencia en el tálamo, bulbo olfatorio y corteza que en el resto del encéfalo. Este depósito característico de la PrPsc, junto al perfil de glicosilación, ha servido además para relacionar posteriormente a la cepa L-EEB con la ECJ esporádica (Casalone *et al.*, 2004; Capobianco *et al.*, 2007). Respecto al comportamiento adoptado por ambas en la inoculación en ratón, se ha observado que el tiempo de incubación en la H-EEB y L-EEB era menor y mayor, respectivamente, que el de la cepa clásica (Buschmann *et al.*, 2006). A partir del descubrimiento de la variedad de agentes causales, han surgido otras cepas atípicas según el diferente peso molecular o mediante la transmisión a modelo murino, como la descrita por Yokoyama *et al.* (2007), aunque se ha llegado a asociar posteriormente con las características de la H-EEB.

Gracias a los protocolos establecidos para la determinación y diferenciación de los agentes causales de la enfermedad, se ha comprobado que la EEB y la vECJ (Collins *et al.*, 2004), identificada en el Reino Unido en 1996 (Will *et al.*, 1996; Saegerman *et al.*, 2004), tienen el mismo origen, es decir, es el mismo agente causal el que origina ambas enfermedades (Collinge *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Lasmézas *et al.*, 2001; Asante *et al.*, 2002). La relación entre la vECJ y la EEB ha sido muy estudiada, debido a la trascendencia de su posible relación causal. Este nexo se ha demostrado mediante estudios epidemiológicos (Will *et al.*, 1996, 1999), experimentos de caracterización de cepas (Collinge *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997) y por inoculación en ratón (Brown *et al.*, 2003), logrando encontrar un vínculo etiológico entre ellas. En estos estudios se ha comprobado que los patrones electroforéticos de los pacientes de vECJ son similares a los de la EEB, pero diferentes a los de la ECJ esporádica e iatrogénica (Baron, 2002a). Los mismos resultados se encuentran tras inoculación en ratón (Bruce *et al.*, 1997), con semejantes características respecto a tiempos de incubación y patrón de distribución de la PrPsc (Hill *et al.*, 1997), además del mismo patrón lesional (Ritchie *et al.*, 2009). Incluso en ratones transgénicos (Tg), que expresan la proteína prión bovina (BoPrP; Scott *et al.*, 1999) u otros que expresan la proteína

humana con metionina en el codón 129 (Asante *et al.*, 2002), el resultado es el mismo, aunque algunos autores no han logrado transmisión de EEB a ratones transgénicos humanos si no se realiza previamente un pase en oveja (Plinston *et al.*, 2011). Posteriormente, hasta se ha logrado demostrar que, estructuralmente, la PrP humana y bovina son idénticas, mediante el estudio de la estructura molecular tridimensional de la proteína por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Lopez García *et al.*, 2000).

Al confirmarse que esta variante de la ECJ se ha desarrollado a partir de la epidemia de EEB, ésta se convierte en una enfermedad zoonótica (Hill *et al.*, 1997; Stack *et al.*, 2009), a pesar de que todavía algunos autores insisten en que no existe evidencia científica de que la vECJ haya sido iniciada por una exposición de los seres humanos a tejidos de animales afectados con la EEB. De todas formas, el aumento del número de casos de EEB debido, según se acepta mayoritariamente, a un cambio en el proceso de fabricación de los piensos destinados al ganado bovino (Wilesmith *et al.*, 1988), ha originado un estado de inquietud de ámbito internacional, especialmente cuando a partir de 1996 empezaron a aparecer los primeros casos de vECJ asociados a consumo de animales afectados que habían pasado a la cadena alimentaria (Taylor y Woodgate, 1997).

En España, los tres primeros casos de EEB fueron descritos a finales del año 2000 (Badiola *et al.*, 2002), presentando un pico de incidencia de la enfermedad en el año 2003. A partir de ahí, el número de casos de EEB sufrió una disminución constante y significativa, asociada a la prohibición de alimentar a los animales con derivados de proteínas de rumiantes y por la aparente falta de transmisión vertical de la enfermedad. Además, el éxito de las medidas adoptadas se reflejó también en el incremento de la edad media de los casos detectados, desde 6,4 años en el inicio de la vigilancia hasta 12,3 años en la actualidad. Desde el año 2000 hasta finales de 2011, se habían detectado un total de 783 focos de EEB en España, la mayoría en la mitad norte de la Península, especialmente en Galicia y Castilla y León (http://rasve.mapa.es/Publica/InformacionGeneral/Enfermedades/ficheros/eeb_acumulado.pdf).

En relación con la vECJ, el primer caso apareció en Reino Unido en 1996 y, desde entonces, hasta finales del 2010, se han diagnosticado 217 en todo el mundo, 5 de los cuales han sucedido en España (Castellanos *et al.*, 2010). El número de enfermos de vECJ no ha aumentado significativamente, aunque el problema persiste, pues sigue habiendo incertidumbre sobre el futuro del número de víctimas de la vECJ que deriven de casos subclínicos que ya existan y que pueden estar relacionados con la variación en el genotipo de la PrP humana y/o de una posible transmisión de vECJ humano-humano (Bishop *et al.*, 2006).

3. Diagnóstico de la encefalopatía espongiforme bovina

Los problemas que surgen en el diagnóstico de las EET se basan principalmente en la naturaleza del agente causal. Debido a que éste es sólo una proteína (hipótesis del prión; Griffith, 1967; Prusiner, 1982) y no posee material genético, es imposible usar herramientas como la PCR. Tampoco pueden usarse técnicas serológicas al no inducir respuesta inmune que permita detectar la presencia de anticuerpos específicos en suero. Como tampoco causa lesiones macroscópicas, el diagnóstico se realiza mediante la demostración del depósito de la proteína prión junto con las lesiones microscópicas específicas de la enfermedad.

3.1. Utilidad de la proteína prión celular y patológica

La detección de PrP^{sc}, que confirma el diagnóstico positivo de la enfermedad, es posible gracias a las diferentes características que adquiere tras el cambio conformacional que la diferencian de la PrP^c.

Una de esas características es la resistencia a enzimas. Mientras que la PrP^c es soluble en detergentes medios y sensible a las proteasas (Oesch *et al.*, 1985; Meyer *et al.*, 1986), la PrP^{sc} es sólo soluble moderadamente en detergentes no iónicos. En cuanto a la resistencia parcial a la digestión con proteinasa K de la PrP^{sc}, aunque

puede variar entre los diferentes agentes de las EET (Bessen y Marsh, 1994; Kuczius y Groschup, 1999), sienta la base de todas las técnicas diagnósticas aplicables, permitiendo reconocer exclusivamente la PrPsc y no la PrPc. Según Collins *et al.* (2004), las variaciones en la estructura terciaria de PrPsc probablemente se correlacionan con diferentes exposiciones de superficie de la proteína, lo que puede explicar las diferencias en los sitios de unión de la proteasa. Así, mientras que la PrPc es rápidamente digerida por proteinasa K, la PrPsc es parcialmente digerida, produciendo fragmentos de 27 a 30 kDa (Oesch *et al.*, 1985). Desde un primer momento, el diferente comportamiento ante la digestión con proteinasa K se ha utilizado para detectar, por métodos diagnósticos tales como inmunohistoquímica o *Western blot*, la PrPsc, y no la PrPc, para diagnosticar las muestras como positivas. Este comportamiento también permite evidenciar diferencias en el perfil glicosilado, base para la distinción de agentes causales mediante los *Western blot* de diferenciación, al presentar una resistencia de la PrPsc a la proteinasa K más baja en EEB y EEB en oveja que en el Scrapie (Espinosa *et al.*, 2007). Este perfil, junto con el hecho de que la PrPc se solubiliza mientras PrPsc se concentra formando depósitos (Meyer *et al.*, 1986) o fibrillas amiloides (Prusiner *et al.*, 1983; McKinley *et al.*, 1991), son y han sido las principales propiedades aprovechadas frecuentemente en estudios diagnósticos y experimentales. La idea expuesta por Muramoto *et al.* (1992), que consiste en que una cantidad similar de PrPc aparece en todos los animales pero la PrPsc se encuentra sólo en el encéfalo afectado, es la base del diagnóstico de la enfermedad.

Respecto a la localización de ambas isoformas también se han visto diferencias. Mediante los exámenes inmunohistoquímicos, se ha demostrado que la PrPc se encuentra en las células nerviosas de los encéfalos de los animales control y la PrPsc se acumula masivamente en el neuropilo de los encéfalos de los animales enfermos (DeArmond *et al.*, 1987; Bruce *et al.*, 1989). Anatómicamente, aunque ambas se pueden llegar a encontrar en todo el sistema nervioso, también se pueden hallar diferencias. Concretamente, la PrPc se encuentra por todo el

encéfalo y médula espinal, principalmente en la membrana neuronal y en las sinapsis, con una mayor abundancia en zonas rostrales que en caudales del SNC en el caso de la EEB como corteza cerebral o hipocampo (Velavos *et al.*, 2006). En cuanto a la PrPsc, su localización exacta, al igual que su expansión por el sistema nervioso, no está del todo claro. Aunque ha sido un aspecto muy estudiado (Sisó *et al.*, 2004), llegándose a observar en todas las regiones del encéfalo (Iwata *et al.*, 2006), su búsqueda ha estado más orientada al diagnóstico inmunoquímico de las EET. En el caso de la EEB, parece que los niveles más altos de PrPsc son detectados en la médula oblongada, cordón espinal y puente (Vidal *et al.*, 2005), pero, aun así, se ha descubierto acumulación de PrPsc en ganado afectado con EEB en encéfalo, médula espinal, ganglios espinales, retina (Iwamaru *et al.*, 2005), médula ósea (Wells *et al.*, 1999) e íleon distal (Wells *et al.*, 1994a, 1998), además de en nervios periféricos (Buschmann y Groschup, 2005; Iwata *et al.*, 2006). Desde el principio, el descubrimiento de que el tronco parecía la parte más afectada (Vidal *et al.*, 2006) y, dentro de él, principalmente el obex (Polak y Zmudzinski, 2012), es la observación que llevó a determinar esa zona como la recomendada para el diagnóstico de rutina en los casos clásicos de EEB (Prusiner *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1997). Además, el hecho de que la PrPsc ya se encontrara en esa zona incluso en estadios tempranos de la enfermedad (Hoffmann *et al.*, 2007), suponía una gran ventaja.

Gracias a las técnicas inmunohistoquímicas posteriormente aplicadas a los modelos experimentales, se describieron, además, los diferentes patrones de depósito que podía adoptar la PrPsc en el sistema nervioso. En el caso de la EEB clásica, la PrPsc aparece en forma de finos depósitos granulares y no se encuentran placas amiloides en tejidos dañados (Novakofski *et al.*, 2005). Lo contrario ocurre en el caso de la cepa atípica L-EEB (Casalone *et al.*, 2004), que se caracteriza precisamente por presentar siempre placas amiloides. Estas placas están compuestas mayoritariamente por PrPsc (DeArmond *et al.*, 1985) y parece que su acumulación puede depender tanto del hospedador como del agente causal (Comoy *et al.*, 2008). Por el contrario, se ha observado que, al inocular la

EEB clásica en ratón, las placas son características, incluso en ratones transgénicos bovinos inoculados con EEB o vECJ (Scott *et al.*, 1999, 2005). Esta ausencia/presencia de placas fue incluso utilizada en su momento como una parte del diagnóstico de diferenciación entre los agentes causales de EEB y del de la EEB con el Scrapie, cuya inoculación en ratón no presentaba placas (Scott *et al.*, 1999; Cordier *et al.*, 2006). En los ratones inoculados con EEB, la presencia de estas placas ha llegado a considerarse como uno de los datos más importantes para el reconocimiento de la enfermedad junto con la vacuolización, proliferación de los astrocitos y la pérdida neuronal (Collinge, 1997).

4. Técnicas diagnósticas

Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la EEB, al igual que en el resto de las EET, han venido determinadas por las características propias de la enfermedad. Esto conlleva la necesidad de aplicar en algunas ocasiones varias de ellas con el fin de llegar a un diagnóstico fiable.

Las técnicas se centran en la detección de:

- Las alteraciones histopatológicas producidas por la enfermedad.
- La isoforma infectiva de la proteína prión (PrPsc) mediante inmunohistoquímica (IHQ), *Western blot* (WB) o microscopía electrónica (ME).
- La infectividad mediante bioensayo en ratón.

De entre todas ellas, el diagnóstico se ha basado principalmente en la detección, mediante diferentes procedimientos, de la PrPsc, aunque a veces esa tarea no resulte tan fácil (Lasmézas *et al.*, 1997).

Las técnicas utilizadas para esta detección en el sistema de vigilancia de la EEB han sido las técnicas de confirmación y las técnicas rápidas. Las técnicas de confirmación, que establece la OIE para el diagnóstico de EEB son más sensibles, aunque son más laboriosas y su realización necesita más tiempo. En España,

hasta el año 1999, el diagnóstico de la EEB se llevaba a cabo por vigilancia pasiva y sólo se analizaban animales que presentaban síntomas sospechosos (Smith y Bradley, 2003). Pero, a partir de 2000, la Unión Europea puso en marcha un intenso programa de vigilancia activa de la enfermedad obligando a analizar a todos los animales cuyo rango de edad era compatible con el padecimiento de la enfermedad. Este aumento en el número de muestras a analizar es lo que provocó la necesidad de aplicar técnicas rápidas que disminuyeran el tiempo de realización de la técnica de una manera efectiva, aunque conllevara una menor sensibilidad. Aun así, siempre que se obtiene un resultado positivo o dudoso con ellas, éste tiene que ser corroborado con las técnicas de confirmación.

Desde la aplicación de los tests rápidos, se diagnosticaron muchos más animales positivos que los que hasta entonces se habían detectado mediante la vigilancia pasiva. Entre el 1 de enero de 2001 y 31 de diciembre de 2006, casi 60 millones de pruebas en el ganado se realizaron dentro de la Unión Europea (casi el 90% en el matadero), detectando más de 4.800 casos de EEB, aproximadamente 1.170 en matadero y 3.700 en los animales de riesgo recogidos en la plantas de transformación (Grassi *et al.*, 2008). Durante ese periodo, la diferencia entre los casos detectados por vigilancia activa y pasiva era notable, pues con esta última sólo habían podido ser detectados 2.361 casos de EEB. Posteriormente, tras la evidencia de la relación entre la vECJ y la EEB, estas técnicas rápidas aún cobraron mayor importancia ya que permitieron retirar un gran número de canales afectadas dirigidas al consumo humano (Grassi *et al.*, 2008), contribuyendo a la protección del consumidor y dando una base de confianza en la seguridad del consumo de carne bovina. La detección precoz de la PrPsc mediante estos análisis fue muy importante para evitar contaminaciones posteriores y la aparición de casos de vECJ en la especie humana, aportando, además, datos más fiables respecto al número de casos de EEB existentes. Por el contrario, a pesar de que algunos estudios defendían que algunas técnicas rápidas como Bio-Rad podían detectar PrPsc en estados iniciales (Grassi, 2003) y otras, como *Prionics-Check Western* y *Prionics-Check LIA*, llegaban a presentar una

correspondencia del 100% con IHQ (Vidal *et al.*, 2005), había sido ampliamente demostrado en la práctica que en ocasiones podían obtenerse falsos negativos con dichos tests, que por IHQ eran confirmados como positivos.

En el año 1999 fueron validados 3 tests rápidos para el diagnóstico de EEB, de los cuales 2 posteriormente fueron excluidos (*European Commission*, 1999). Todos ellos fueron evaluados en bovinos clínicos que ya habían sido diagnosticados por histopatología y se basaban en la detección inmunológica y la movilidad de la porción residente de la PrPsc en el SNC (Grassi *et al.*, 2008). A partir del año 2001 (*European Commission*, 2001), momento en que se implantó la vigilancia activa, la importancia de estas técnicas fue mayor, por lo que se validaron dos tests más y se valoró la autólisis de las muestras como un posible factor presente en campo (*European Commission*, 2004). Por último, en el año 2004, 7 tests nuevos fueron validados. Actualmente, son nueve las técnicas rápidas que, basadas en protocolos de ELISA y *Western blot*, están admitidas por la Comunidad Europea para el diagnóstico de la EEB (Gavier-Widén *et al.*, 2005). Todas ellas han sido evaluadas en cuanto a su sensibilidad, especificidad y límite de detección. Son: *Prionics-Check Western test*, *Enfer test* y *Enfer TSE Kit versión 2.0*, *Enfer TSE versión 3*, *Bio-Rad TeSeE test*, *Prionics-Check LIA test*, *IDEXX HerdCheck BSE Antigen Test Kit (EIA)*, *Prionics Check PrioSTRIP*, *Roboscreen Beta Prion BSE EIA Test Kit* y *Roche Applied Science PrionScreen*.

De las nueve técnicas rápidas oficiales de diagnóstico de la EEB, se desarrollan brevemente a continuación las técnicas aplicadas en el presente trabajo, tanto la empleada en las muestras bovinas como las aplicadas en las muestras murinas:

- *Prionics®-Check WESTERN test*. El WB de Prionics es una de las técnicas rápidas utilizadas de rutina para el diagnóstico de la enfermedad debido a su alta sensibilidad y temprana detección de PrPsc que, según lo publicado en algunos estudios, es incluso anterior al cambio espongiiforme (Cooley *et*

al., 2001). El diagnóstico se basa en la diferente susceptibilidad de la PrPc y la PrPsc frente al tratamiento de la proteasa, que permite eliminar la primera y sólo detectar la patológica mediante la migración en una electroforesis en gel de poliacrilamida y la identificación de los fragmentos resultantes por un anticuerpo monoclonal. La presencia de 3 bandas determina la consiguiente presencia de PrPsc en la muestra, confirmando la positividad de la misma. Los protocolos de WB de confirmación son muy lentos, con numerosas centrifugaciones que posibilitan la purificación y centrifugación de la proteína (Stack *et al.*, 1996). Pero los utilizados para técnicas rápidas fueron adaptados sustituyendo estas ultracentrifugaciones con *buffers* de homogeneización, que no alcanzan la concentración de la proteína lograda en el WB de confirmación, pero aceleran la obtención del resultado (Gavier-Widén *et al.*, 2005). Aun así, es posible determinar los animales con EEB antes de la aparición de los signos clínicos (Schaller *et al.*, 1999) e, incluso, se pueden confirmar resultados no concluyentes obtenidos en la histología (Katz *et al.*, 1992) o en muestras autolíticas (Schaller *et al.*, 1999). En su momento, se describió esta técnica como la más fiable de las técnicas rápidas (Polak *et al.*, 2003), utilizándose para el análisis rutinario de todos los animales destinados a consumo, logrando el diagnóstico de muchos casos positivos y evitando que éstos llegaran a la cadena alimentaria (Oesch *et al.*, 2000). Sin embargo, con el aumento de casos de Scrapie atípico, el uso de esta técnica disminuyó drásticamente.

- Bio-Rad Platelia BSE. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada porque su sensibilidad para la detección de PrPsc en los casos de EEB es, según algunos autores, equivalente a la de los bioensayos en ratón afectados con EEB (Grassi *et al.*, 2001). Consiste en un inmunoanálisis de doble anticuerpo (método sandwich) para la detección de PrPsc, efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración.

- BetaPrion BSE EIA Test Kit de Roboscreen. Consta de un primer proceso de purificación de la PrPsc y otro de detección. Se basa en un inmunoanálisis que utiliza dos anticuerpos monoclonales diferentes dirigidos contra dos epítomos presentes en la PrPsc bovina en estado muy desplegado.

Las técnicas de confirmación son aquéllas que han demostrado la mayor fiabilidad de resultados ofrecidos en el diagnóstico de la EEB y de las EET en general. A pesar de ser más laboriosas y necesitar más tiempo hasta la obtención de un resultado en comparación con los tests rápidos, destacan por su mayor sensibilidad y especificidad para el reconocimiento de la enfermedad. Por esta razón, de forma rutinaria todas las muestras que han dado un resultado positivo o dudoso en los tests rápidos son sometidas a estas técnicas para confirmar el diagnóstico en los Centros de Referencia.

La técnica histológica tiene como objetivo el hallazgo de vacuolización en determinadas áreas del SNC. En caso de que tras su aplicación se obtenga un resultado dudoso o negativo, se debe recurrir a cualquiera de las siguientes técnicas: inmunohistoquímica, *Western blot*, microscopía electrónica o bioensayo. Poco a poco, esta técnica ha dejado de utilizarse exclusivamente, complementándose casi siempre con otras debido a la posible ausencia de alteraciones histopatológicas antes de la aparición de los signos clínicos. Los métodos discriminatorios para el diagnóstico, utilizados de forma adicional a la valoración histológica, son el *Western blot* o la inmunohistoquímica. También la microscopía electrónica, aunque mucho menos aplicada ya que, a pesar de presentar la misma especificidad y fiabilidad que las anteriores, al tener un protocolo más laborioso, no se utiliza para el diagnóstico de rutina.

En resumen, con la implantación de la vigilancia activa, se instauró el protocolo basado en que las muestras de EEB tenían que ser sometidas a las técnicas rápidas, y sólo las positivas o dudosas, a los métodos de confirmación que figuran en el manual de la OIE: examen histológico, análisis

inmunohistoquímico, inmunotransferencia SAF (*Western Blot*), microscopía electrónica y bioensayo en ratón.

4.1. Histología

El diagnóstico histológico en todas las EET tiene como objetivo la búsqueda, en determinadas áreas específicas del tejido nervioso central, de espongiosis y/o vacuolización de los cuerpos neuronales. Como ha sido ya introducido anteriormente, también se observan gliosis y pérdida neuronal, pero nunca lesiones inflamatorias (Debeer *et al.*, 2002). Lo más característico es que la vacuolización del neuropilo (espongiosis) y/o de las neuronas, está localizada de forma simétrica y bilateral en varias secciones del tronco del encéfalo, especialmente obex, puente y mesencéfalo (Harris, 2004). En el caso de la EEB, las áreas más afectadas son el núcleo del tracto solitario y el núcleo del tracto espinal del nervio trigémino (Wells *et al.*, 1989). En estas zonas, la vacuolización del neuropilo se considera una lesión específica de la enfermedad (Gavier-Widén *et al.*, 2005).

Gracias al análisis histológico se diagnosticó en su momento el primer caso de EEB en 1986 y, desde entonces, fue una herramienta útil para estudiar la enfermedad. Además, esta distribución de la vacuolización, junto con los tiempos de incubación (Fraser y Dickinson, 1968), fueron los principales criterios para definir los diferentes agentes causales en encéfalos de ratones afectados (Fraser y Dickinson, 1973).

Aun así, como ya se ha apuntado anteriormente, a pesar de la importancia que tuvo en el diagnóstico de la enfermedad en un principio, la técnica histológica, en estos momentos, suele ir acompañada del estudio inmunoquímico de la presencia de PrPsc, debido a que la vacuolización por sí sola no aporta un diagnóstico definitivo, ya que puede deberse a otras causas o enfermedades (McGill y Wells, 1993). Además, la histología sólo ofrece resultados positivos

durante un corto espacio de tiempo antes de la aparición de los signos clínicos, mientras que la inmunohistoquímica, por ejemplo, detecta los depósitos de PrPsc mucho tiempo antes (Kübler *et al.*, 2003). Curiosamente, los cambios vacuolares no parecen tener correlación con la presencia de depósitos de PrPsc (Polak *et al.*, 2003; Miyashita *et al.*, 2004). Por otro lado, la autólisis originada por retrasos en el procesamiento del tejido puede provocar unas alteraciones microscópicas que implican su confusión con la vacuolización patológica (Fix y Garman, 2000). Por eso, no todas las muestras son adecuadas para el análisis histológico y la vacuolización, por sí sola, no suele considerarse suficiente para diagnosticar la EEB.

4.2. Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica se basa en el reconocimiento de antígenos específicos, que en este caso son determinados epítomos de la PrPsc, sobre cortes histológicos mediante una reacción antígeno-anticuerpo que, por la unión de moléculas marcadas, es posteriormente visualizada mediante microscopía óptica.

Debido a que la PrPsc representa el agente causal y su presencia puede asociarse exclusivamente a la existencia de la enfermedad, su detección por análisis inmunohistoquímicos se ha convertido en una de las bases del diagnóstico y de la investigación de la enfermedad (Yokoyama, 1999). En la actualidad, es una de las técnicas de confirmación para las EET (van Keulen *et al.*, 1995), mayoritariamente utilizada en muchos laboratorios de confirmación, que, además de servir para el diagnóstico, aporta información sobre el fenotipo de la enfermedad en función de la distribución de los depósitos de la PrPsc en el encéfalo (Manning *et al.*, 2008).

La IHQ comenzó a sustituir a la histología, técnica más aceptada y usada en un primer momento (Arsac *et al.*, 2007), por lo que se empleó cada vez con más frecuencia tanto en el diagnóstico de las EET (Bencsik *et al.*, 2005) en general

como de la EEB en particular (Debeer *et al.*, 2001, 2002), por su mayor sensibilidad incluso en tejidos autolíticos (Monleón *et al.*, 2003). Su importancia aumentó porque podía diagnosticar muestras que presentaban resultados no concluyentes en las técnicas histológicas (Fix y Garman, 2000) debido a que estaban previamente fijadas o congeladas (Debeer *et al.*, 2002) o autolíticas (Debeer *et al.*, 2001). Actualmente, esta técnica, más que sustituir, complementa a la histología en el diagnóstico de la EEB y se considera una herramienta de alta sensibilidad y especificidad para la detección de la PrPsc (Miller *et al.*, 1994; Debeer *et al.*, 2001) que, a su vez, constituye el marcador más fiable de las EET (Bolton *et al.*, 1982).

Al principio se utilizaba esta técnica para detectar tanto la forma proteica sensible como la resistente en tejidos de animales afectados (González *et al.*, 2005). Pero, posteriormente, se ha utilizado para detectar la acumulación específica de PrPsc. Así, aunque hay algunos anticuerpos que parecen discriminar entre las isoformas normal y patológica (Paramithiotis *et al.*, 2003; Curin Serbec *et al.*, 2004), en la mayoría de los casos los anticuerpos no son específicos para el marcaje exclusivo de la PrPsc (Ryder *et al.*, 2001). Por esta razón, para el diagnóstico de las muestras, se utiliza un pretratamiento de desenmascaramiento de epítomos previo (Manning *et al.*, 2008). Una vez eliminada por digestión la PrPc, la PrPsc se marca con anticuerpos monoclonales específicos, visualizándose una reacción antígeno-anticuerpo a través de los sistemas de visualización adecuados.

En el caso de la EEB, la PrPsc se observa concentrada en núcleos específicos del encéfalo como el tracto espinal y el del núcleo dorsal del nervio vago. La tinción es de tipo granular y aparece en el neuropilo de la materia gris. La mayoría son agregados adyacentes a núcleos celulares gliales y dentro o en la periferia del pericarion neuronal (Salguero *et al.*, 2006). Aunque se puede encontrar tinción en todas las áreas del encéfalo, la reacción es más fuerte en el tálamo, puente y médula oblongada, moderada en el cuerpo estriado y débil en la corteza cerebral (Kimura y Haritani, 2008).

Esta diferente distribución de la PrPsc, analizada mediante la inmunohistoquímica, fue lo que sirvió para la discriminación de los agentes causales (Wood *et al.*, 1997; Orge *et al.*, 2000). La ventaja de la técnica inmunohistoquímica se basa en el amplio campo de posibilidades que ofrece respecto al diagnóstico de la enfermedad y a su estudio, con avances en el análisis del tipo celular asociado al depósito de PrPsc y su distribución topográfica, lo que aporta información en el reconocimiento de las denominadas cepas atípicas de la enfermedad frente a la cepa clásica (Debeer *et al.*, 2003; Casalone *et al.*, 2004). Con ella, incluso se ha llegado a diferenciar, mediante los patrones de depósito de PrPsc, ovejas y cabras afectadas con EEB respecto a las de Scrapie (Martin *et al.*, 2005; Thuring *et al.*, 2005).

Cabe destacar que, actualmente, en el caso del Scrapie, esta técnica permite diagnosticar la enfermedad *in vivo*, mediante el análisis inmunohistoquímico de biopsias de tonsila (Schreuder *et al.*, 1998), recto o tercer párpado (Monleón *et al.*, 2011). Aun así, sólo con el análisis inmunohistoquímico de estas biopsias no se puede diferenciar si la enfermedad está causada por el agente del Scrapie o de la EEB, salvo en algunos casos con anticuerpos muy concretos (Thuring *et al.*, 2005).

No obstante, un problema de esta técnica es que, a pesar de ser ampliamente utilizada en muchos laboratorios, no existe una homogeneidad en el protocolo usado en todos ellos (Lloyd *et al.*, 2004; Masujin *et al.*, 2008), dificultando la uniformidad y comparación de resultados de orígenes diversos. A pesar de todo, esta técnica se sigue considerando como una alternativa más sencilla y rápida respecto a otras técnicas antiguamente utilizadas como la detección de fibrillas asociadas a Scrapie por microscopía electrónica (Graber *et al.*, 1995).

4.3. Western blot

La técnica de *Western blot* permite detectar la presencia de PrPsc en la muestra sometida a análisis, confirmando de una manera efectiva la positividad de la

misma. Para este propósito, se sirve de nuevo de la resistencia de la PrPsc, y no de la PrPc, a la digestión con proteasas, al igual que sucedía en la técnica inmunohistoquímica. La diferencia es que, en la técnica de *Western blot*, mediante una electroforesis en gel, la PrPsc se separa y migra según su peso molecular, observándose un patrón de bandas características mediante una transferencia de la reacción antígeno-anticuerpo a una membrana visible al revelar adecuadamente.

La primera técnica de *Western blot* utilizada para propósitos diagnósticos fue el *Western blot* de confirmación de la OIE (Stack, 2004) que usaba una cantidad de material inicial relativamente grande (4 gr), una extracción con detergente, largos pasos de ultracentrifugación para concentrar la PrPsc y una digestión con la proteinasa K para eliminar la PrPc. Posteriormente, las nuevas técnicas de *Western blot* partieron de cantidades más pequeñas de material encefálico y, gracias al uso de apropiadas combinaciones de *buffers* de homogeneización, la ultracentrifugación acabó siendo minimizada. Además, la aplicación de anticuerpos altamente sensibles para el revelado de las bandas aumenta la sensibilidad de la técnica.

El diagnóstico de la enfermedad mediante la técnica de *Western blot* se basa en las propiedades de la PrPsc. La PrPc y la PrPsc tienen un peso molecular de 33-35 kDa (Prusiner, 1998b) pero, al ser la PrPsc parcialmente resistente a esta digestión, resulta un fragmento proteico de 27 a 30 kDa (PrP 27-30; Oesch *et al.*, 1985). Las muestras sometidas a electroforesis evidencian un patrón glicosilado de 3 bandas: diglicosilada, monoglicosilada y no-glicosilada. La sola presencia de las bandas ya permite confirmar el diagnóstico positivo de la muestra pero, además, la altura e intensidad de cada una, incluso su presencia/ausencia utilizando determinados anticuerpos, constituye un patrón de glicosilación que es diferente y típico de cada agente causal, lo que permite usar esta técnica como método de diferenciación tras la aplicación de protocolos adecuados para ello (Stack *et al.*, 2002; Biacabe *et al.*, 2004).

El perfil de glicosilación de la EEB clásica se caracteriza por: 1) predominancia, hasta un 70% según Hagiwara *et al.* (2007), y mayor peso molecular (Baron *et al.*, 1999) de la banda diglicosilada, 2) posición bastante baja de la no-glicosilada y 3) baja intensidad, o incluso ausencia de las bandas, con el anticuerpo P4 (Stack *et al.*, 2002; Cordier *et al.*, 2006). Este patrón es específico, único y se mantiene en infecciones experimentales en ratones (Kuczius y Groschup, 1999; Baron y Biacabe 2001; Baron *et al.*, 2004).

Como se ha indicado, este patrón característico permite diferenciar la cepa EEB clásica del Scrapie (Thuring *et al.*, 2004) mediante los *Western blot* de diferenciación (Loiacono *et al.*, 2010), cuya utilización es obligatoria desde 2005 en pequeños rumiantes (Reglamento 36/2005). En estos casos, la diferente sensibilidad a la digestión con la proteinasa K, junto con la diferente especificidad de determinados anticuerpos, condiciona un patrón diferente específico de cada agente. Concretamente, la diferenciación entre la EEB (Stack *et al.*, 2002; Thuring *et al.*, 2004) y el Scrapie (Vorberg y Priola 2002) mediante esta técnica, se basa en la ausencia de señal con el anticuerpo P4 en la EEB respecto al Scrapie y en las diferencias en la posición de la banda no glicosilada, más ligera en los casos de EEB respecto a la posición natural de esta banda en el Scrapie (Hope *et al.*, 1999; Baron y Biacabe, 2001; Stack *et al.*, 2002; Lezmi *et al.*, 2004), incluso en comparación con los casos de EEB en la oveja (Baron *et al.*, 2000).

Respecto a las cepas atípicas de EEB, precisamente, las diferencias en el patrón de glicosilación permitieron descubrir esos primeros casos atípicos que tenían un comportamiento diferente al observado hasta entonces en la cepa clásica: la L-EEB y H-EEB. En ellos, como ya se ha indicado anteriormente, la principal diferencia se centraba en la banda no glicosilada, que era más ligera en el caso de la L-EEB (además la banda monoglicosilada era predominante, Lombardi *et al.*, 2008) y más pesada en la H-EEB, respecto a la situación normal de la banda en el caso de la EEB clásica. No sólo en la diferenciación del agente causal esta técnica fue determinante, sino también, en su momento, en la

confirmación de que la vECJ y la EEB tenían el mismo origen y se correspondían con un único agente, ya que el patrón de glicosilación era el mismo (Collinge *et al.*, 1996; Ironside *et al.*, 2002).

Por todas estas razones, la técnica de *Western blot* ha tenido y tiene tanta importancia en el diagnóstico de la EEB. La constatación de que es una técnica que no presenta ninguno, o muy pocos, falsos positivos y que puede diagnosticar muestras de pobre calidad (Carra *et al.*, 2009), la convierte en una de las de elección como técnica de confirmación, además de ser indispensable en la diferenciación de cepas. Al igual que en la inmunohistoquímica, hay diversos protocolos de *Western blot* que se utilizan en los diferentes laboratorios (Lloyd *et al.*, 2004), a pesar de que todos se basan en la evidencia de diferentes patrones de glicosilación que parecen depender no sólo del agente, sino también del hospedador (Somerville, 1999).

4.4. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se ha utilizado desde siempre para el diagnóstico de las EET mediante la observación de un tipo de fibrillas presentes exclusivamente en individuos afectados por la enfermedad. Estas fibrillas fueron descritas por primera vez por Merz *et al.* (1981), eran diferentes morfológicamente a otros tipos de fibrillas observadas hasta entonces y fueron denominadas fibrillas asociadas a Scrapie (SAF). Se han observado en el ratón (Merz *et al.*, 1981), oveja (Scott *et al.*, 1987), humanos (Narang y Perry, 1990) y también en bovino donde han sido descritas en varios estudios (Scott *et al.*, 1990, 1992; Wells *et al.*, 1994b).

En su momento, estas fibrillas fueron el primer hallazgo morfológico asociado a las EET observado por microscopía electrónica. En un principio, incluso se llegó a decir que las SAF eran las únicas estructuras características de este grupo de enfermedades (Hope *et al.*, 1986) y que estas fibrillas podían estar

formadas por el agente etiológico (Merz *et al.*, 1984). En estudios posteriores, se comprobó que esto no era del todo cierto. Se vio que el mayor componente de las fibrillas era una glicoproteína resistente a proteasas que tenía un peso molecular de 27000 a 30000 D (PrP²⁷⁻³⁰ kDa), obtenido por la proteólisis parcial de la PrP^{sc} (33-35 kDa; Bolton *et al.*, 1984, 1985). Esto convertía a las fibrillas en formas auto-multiplicativas fibrilares, con un componente amiloide, y su fragmentación podía provocar el aumento exponencial en el título del agente causal (Collinge y Clarke, 2007). Posteriormente, mediante la microscopía electrónica (Merz *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1983), se descubrió que estas fibrillas contenían proteínas amiloides, como las típicas de otras enfermedades neurodegenerativas del SNC (Multhaup *et al.*, 1985; Roberts *et al.*, 1988), como el Alzheimer. En ambos casos, las proteínas, que eran parte del agente, derivaban de proteínas codificadas por el hospedador y las fibrillas resultantes parecían similares, viendo coincidencias ultraestructurales entre las SAF y las estructuras filamentosas anormales encontradas en el Alzheimer, PHF (*Paired Helical Filaments*) y amiloide. Aunque más tarde se descubriría que no eran del todo idénticas (Merz *et al.*, 1984, 1987), porque parecían no estar compuestas de las mismas proteínas al no unirse los mismos anticuerpos (Kascsak *et al.*, 1986), esta relación entre las dos enfermedades quedó patente.

Finalmente, parece haberse llegado a la conclusión de que estas fibrillas proceden de la proteólisis parcial de vesículas membranosas ricas en PrP^{sc} observadas en el tejido encefálico de los individuos afectados. Suelen tener una media de 11 nm de diámetro, una longitud media de 165 nm y unas características independientes del hospedador y del genotipo (Kascsak *et al.*, 1986). Aun así, existe una gran variabilidad en las medidas observadas en las fibrillas. Su tamaño viene además determinado por el tratamiento previo con SDS, que acorta el tamaño de las mismas, como se describe en el trabajo de Narang y Perry (1990). En él, se demuestra una diferencia en el diámetro de las fibrillas desde 50 nm sin SDS hasta 16-20 nm en muestras tratadas con SDS. Aunque al principio parecía que existían sólo dos clases de fibrillas (Merz *et al.*,

1981), posteriores estudios han sugerido que la estructura de las SAF puede ser más diversa y que las pequeñas diferencias en la morfología (Liberski *et al.*, 1991) y la frecuencia de agregación de los filamentos aparecen dependiendo de la cepa del agente causal, del tipo de enfermedad y, probablemente, también del procedimiento de aislamiento que se realice en el laboratorio. Lo que sí se ha demostrado es una asociación entre la visualización de SAF y la presencia de la PrPsc del Scrapie (Bolton *et al.*, 1982; Diringer *et al.*, 1983; Hilmert y Diringer, 1984), aunque no se ha conseguido confirmar si SAF y la proteína son la manifestación estructural del agente o simplemente estructuras que copurifican con la infectividad (Kascsak *et al.*, 1985). Lo que sí parece cierto es que esa estructura típica de las SAF podría ser lo que confiere al agente patógeno su inusual estabilidad a la inactivación química y física (Kascsak *et al.*, 1986).

En estudios realizados en modelos murinos, las SAF ya se demostraban por microscopía electrónica a los 60-70 días post-inoculación, al mismo tiempo que empezaban a aparecer los cambios bioquímicos y de comportamiento del animal (Merz *et al.*, 1981). En otros estudios, esta aparición ocurría más tarde, pues se observaban a los 86 días post-inoculación (Rubenstein *et al.*, 1986). A pesar de la variación en el tiempo, sí se comprobaba en todos los casos que un aumento en el número de SAF, a medida que la enfermedad progresaba, coincidía con el aumento de la infectividad de la muestra (Diringer *et al.*, 1983; Merz *et al.*, 1983; Hilmert y Diringer, 1984).

Respecto a la presencia en tejido normal, se había observado que la proteína que componía las fibrillas no se agregaba para formar SAF (Narang y Perry, 1990). De hecho, se comprobó, mediante estudios sobre pacientes control (Narang y Perry, 1990), que las fibrillas no estaban presentes en encéfalos normales o en encefalopatías no espongiiformes (Merz *et al.*, 1984), confirmándose que estas partículas tubulofilamentosas (SAF) podían ser usadas como una característica de identificación de las EET. La utilización de estas fibrillas como una herramienta más para el diagnóstico ya se había descrito por Gibson *et al.* (1987) como una

aplicación de la microscopía electrónica al diagnóstico del Scrapie en encéfalos de ovejas afectadas. A veces, la presencia de estas fibrillas no conllevaba vacuolización neuronal, pero su hallazgo sí que indicaba la existencia del proceso patológico de las EET (Hope *et al.*, 1988).

Respecto al caso concreto de la EEB, ya se enunciaba en Hope *et al.* (1988) que el descubrimiento de fibrillas similares a las asociadas al Scrapie en extractos tratados con detergente de encéfalos afectados por EEB permite el diagnóstico clínico y patológico de la enfermedad, siendo considerado además un método muy sensible (Scott *et al.*, 1992). En este caso, tras haber estudiado y comparado su tamaño, resistencia a la proteasa, inmunorreactividad, unión a la lectina y secuencia parcial de la proteína N-terminal (Hope *et al.*, 1988), se sabe que la mayor proporción de proteína de las fibrillas evidenciadas en casos de EEB es el homólogo bovino de PrP. Las fibrillas bovinas pueden encontrarse en todo el encéfalo, aunque varía su distribución entre diferentes áreas del mismo, y se asemejan a las fibrillas encontradas en la oveja con Scrapie en tamaño y forma. Además, al igual que ellas, presentan una aparente masa molecular de 33-35 kDa y son parcialmente resistentes a la proteólisis con proteinasa K, formando fragmentos de peso molecular de 27-30 kDa (Hope *et al.*, 1988).

Gracias a los avances conseguidos con la microscopía electrónica junto con la técnica de IHQ con oro coloidal, aplicada a estudios ultraestructurales (Jeffrey *et al.*, 1995), se ha logrado investigar acerca de la formación de estas fibrillas y a identificar la presencia de estas fibrillas como base para el diagnóstico de la enfermedad (Cho, 1986; Wiley, *et al.*, 1987). En el trabajo que se presenta aquí, la IHQ con oro coloidal se utiliza para confirmar que las fibrillas observadas en las muestras constituyen las denominadas fibrillas SAF.

A pesar de su sensibilidad y efectividad, actualmente esta técnica se encuentra en desuso debido probablemente a la dificultad en el acceso al microscopio y a la laboriosidad del protocolo.

4.5. Inoculación en modelo murino

El bioensayo en ratón se emplea para estudiar el comportamiento de la enfermedad en un modelo vivo, tras transmitir el agente causal de la enfermedad por diferentes vías. La ventaja que presenta es que se puede conseguir un mayor control sobre las variables que afectan a la evolución de la enfermedad. Aun así, no se suele utilizar como técnica de confirmación debido al tiempo y medios necesarios que se requieren, pero sí como una herramienta muy útil para investigación y para la obtención de resultados definitivos. Es la única forma de comprobar directamente la presencia del agente causal (Kübler *et al.*, 2003) y se ha considerado como el método más sensible para la detección de la PrPsc (Novakofski *et al.*, 2005). Utilizando varias líneas celulares, se podía detectar PrPsc, pero no se podía medir con otras técnicas bioquímicas (Weissmann *et al.*, 2002; Vorberg *et al.*, 2004). Además, se convierte en una de las técnicas de elección para la caracterización del agente causal, al ofrecer mucha más información sobre el desarrollo, comportamiento y progreso de la enfermedad en el animal respecto a las otras técnicas ya descritas.

En el estudio de las EET en general (Scott *et al.*, 1999; Crozet *et al.*, 2001; Vilotte *et al.*, 2001) y de la EEB en particular (Beck y Daniel, 1969b; Buschmann *et al.*, 2000), el método de la inoculación en modelo murino ha sido muy importante al permitir demostrar la infectividad de la proteína prión (Yokoyama *et al.*, 2007). Al principio, esta técnica se utilizaba especialmente para el estudio del origen del agente etiológico de la enfermedad (Prusiner, 1982) pero, posteriormente, la inoculación en modelo murino se ha utilizado también en los estudios de caracterización de las propiedades biológicas del agente causal. No se ha podido aclarar los mecanismos precisos en que basan su aparente diversidad (Baron, 2002b), pero permite distinguir diferentes agentes. Esta caracterización se fundamenta en parámetros controlados genéticamente como el periodo de incubación (Dickinson y Meikle, 1969) y el estudio histopatológico (Fraser y Dickinson, 1973). También la neuropatología y propiedades bioquímicas de los

agentes causales han sido estudiadas de este modo (Lloyd *et al.*, 2004).

Uno de los aspectos claves que regulan la transmisión en el modelo murino es la barrera de especie. Como ya se ha comentado anteriormente, en el caso de la EEB, el agente causal posee una gran capacidad para afectar a otras especies (Dawson *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 1993; Bruce *et al.*, 1994). Por ello, además de facilitarse la transmisión de la enfermedad, se mantienen las características propias de cada agente causal de origen bovino, incluso tras pasar por varias especies (Bruce *et al.*, 1994), incluyendo humanos (Collinge *et al.*, 1996), lo que convierte al bioensayo en una técnica muy efectiva para el estudio de la EEB. Por esta razón, esta transmisibilidad del agente causal (Fraser *et al.*, 1992; Green *et al.*, 2005) se ha convertido en una herramienta muy útil para el diagnóstico y para el estudio de la enfermedad, por su mayor sensibilidad respecto a otras técnicas y por ofrecer un diagnóstico fiable. Sin embargo, a pesar de que la especificidad de la técnica es muy alta, pues no se han detectado falsos positivos, un resultado negativo no puede descartar la presencia de la enfermedad. En algunos casos, un resultado negativo puede no tratarse de un diagnóstico definitivo porque se ha demostrado que el número de ratones afectados, después de la inoculación con algunos agentes causales de las EET naturales, suele ser baja (Baron, 2002b).

A pesar de todas las ventajas ofrecidas por el bioensayo en ratón, se ha observado que varios factores pueden influir en la transmisión del agente presente en una muestra positiva y, por lo tanto, en la detección del agente causal en el animal afectado. En algunos animales, aunque esta transmisión ocurre, el periodo de incubación es largo y la susceptibilidad es baja en el primer pase (Hill *et al.*, 2000). Además, pueden emerger nuevas características en los nuevos hospedadores, sugiriendo una relación entre la barrera de especie, cambios en la conformación de la PrP^{sc} y la identificación de nuevos agentes causales (Peretz *et al.*, 2002). El factor que más varía es el tiempo de incubación, controlado por el gen *Sinc* (*Scrapie Incubation*), con los dos alelos s7 y p7, resultando ser el mayor determinante de la duración del periodo de incubación en el ratón (Dickinson *et*

al., 1968). El principal problema que se plantea es que, al existir esta barrera de especie, a veces este periodo se alarga en exceso. Sólo con sucesivos pases, este tiempo se va acortando, al mismo tiempo que el agente se adapta a los hospedadores y se estabilizan sus características patológicas (Kimberlin y Walter, 1977). Por ejemplo, en el caso de la EEB, la transmisión a los ratones requiere una dosis infectiva mil veces superior a la requerida para su transmisión al ganado bovino (Bradley, 1999).

Por todas estas razones, los ratones transgénicos y *knock out* han supuesto un gran avance en la investigación de las enfermedades priónicas (Raeber *et al.*, 1998). La ventaja es que los periodos de incubación se acortan sustancialmente, variando desde 1 año (Lasmézas *et al.*, 1997) hasta 250 días (Scott *et al.*, 2000) en los casos de inoculación con el agente de la EEB. Estos ratones, que presentan una PrPc homóloga a la de la especie de origen, ya se habían usado con la enfermedad del Scrapie (Vilotte, 2001) y se han aplicado también al estudio de la EEB para facilitar la transmisión experimental y disminuir el tiempo de incubación respecto a los ratones convencionales (*wild type*). En el caso de la EEB, los más utilizados han sido los ratones transgénicos bovinizados (Buschmann *et al.*, 2000; Castilla *et al.*, 2003), que son más sensibles a los priones bovinos (Prusiner, 1997) y con los que se consigue disminuir el periodo de incubación respecto a otros modelos murinos (Baron, 2002b). Así, se llegan a obtener periodos de incubación de 250 a 400 días con estos ratones transgénicos bovinizados, con respecto a los 450 días necesarios en ratones *wild-type* (Buschmann *et al.*, 2000).

Además, no sólo se acorta el tiempo de incubación, sino que se ha comprobado que la expresión de PrP bovina en estos ratones elimina la barrera de especie para la transmisión de la EEB (Scott *et al.*, 1999). Esta innovación ha facilitado la realización de estudios posteriores, ya que estos ratones transgénicos que sobreexpresan PrP (TgBoPrP) pueden llegar a ser diez veces más sensibles que el bovino y 10.000 veces más sensibles que los ratones *wild-type* (Safar *et al.*,

2002). Concretamente, se ha determinado que los títulos de PrPsc son aproximadamente de 10^7 ID₅₀ unidades por gramo de encéfalo bovino cuando son medidos en ratones bovinizados (TgBoPrP). Aun así, era necesario valorar si tras este paso por ratones TgBoPrP, las características del agente de la EEB se mantenían, lo que quedó ampliamente demostrado con la preservación de sus características bioquímicas (Espinosa *et al.*, 2007) y las lesiones típicas de la EEB (Scott *et al.*, 2005). Así, se comprobó que el agente causal no se altera (Scott *et al.*, 1999), incluso tras varios pases seriados en ratones bovinizados. Todas estas ventajas del uso del bioensayo en ratón han sido muy útiles para el estudio de la enfermedad y han servido como una valiosa herramienta para discriminar el Scrapie y la EEB en el ganado ovino (Espinosa *et al.*, 2007).

Existen muchos tipos de ratones transgénicos, todos ellos perfectamente detallados en los diferentes trabajos donde se describen por primera vez. Concretamente, los ratones TgbovXV, que son los que han sido usados en este experimento, han sido elegidos porque aportan una disminución en el tiempo de incubación y una mayor sensibilidad respecto a los ratones no transgénicos. Estos ratones transgénicos son 10.000 veces más sensibles a la infección de EEB que los ratones convencionales y diez veces más sensibles que los bovinos (Buschmann y Groschup, 2005). Aunque en otros trabajos se han obtenido los mismos resultados que con los TgBoPrP (Masujin *et al.*, 2008), parece que el uso de estos animales tiene la ventaja de permitir la detección de bajas dosis de infectividad (Buschmann *et al.*, 2000), con un título de $10^{7.67}$ ID₅₀/g (Buschmann y Groschup, 2005). Por esta razón, este tipo de ratones ha sido ampliamente utilizado en muchos trabajos, tanto para estudiar el comportamiento y acumulación de la PrPsc en estados terminales de EEB (Buschmann y Groschup, 2005) como en las cepas atípicas (Yokoyama *et al.*, 2007) para demostrar la conversión de la BASE en EEB tras varios pases (Capobianco *et al.*, 2007).

A pesar de todas las posibilidades que ofrece el amplio número de técnicas aplicables para el diagnóstico de las EET, hay que tener en cuenta ciertos factores que pueden interferir en el éxito de la obtención de un diagnóstico definitivo. Los principales problemas suelen derivar de las características y estado de la muestra, pero también del origen de la misma, que puede identificar un diferente agente causal.

La conservación de las muestras es muy importante para garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados de las técnicas. Normalmente, cuando las muestras están frescas y no ha pasado mucho tiempo desde el sacrificio o muerte y la llegada de la misma al laboratorio, es muy probable que el diagnóstico sea satisfactorio. El problema surge cuando ese tiempo se alarga y las muestras comienzan a sufrir un cierto grado de autólisis, lo que puede dificultar un diagnóstico fiable y definitivo. Esto es especialmente manifiesto en el caso de la histopatología, que proporciona numerosos falsos diagnósticos negativos debido a la autólisis (Wells *et al.*, 1994b).

El otro problema que puede surgir derivado de la naturaleza de la muestra es la baja concentración de la PrPsc existente en la misma, lo que puede determinar que las técnicas aplicadas no sean capaces de detectarla, dando lugar a un resultado negativo a pesar de que ésta sea positiva (falsos negativos). Este dato hay que tenerlo en cuenta tanto al valorar en cada caso la positividad o negatividad de la muestra como al estandarizar las técnicas que tendrán que ser capaces de solventar ese problema.

Respecto al origen de la enfermedad, diferentes agentes causales pueden provocar distintos resultados en el diagnóstico. Tanto en la EEB clásica como en las cepas atípicas encontradas hasta el momento, las características bioquímicas y las propiedades que presentan respecto a las técnicas diagnósticas utilizadas de rutina, han sido bien descritas. El problema puede aparecer cuando, debido a esta diversidad de agentes causales, aparecen resultados no esperados asociados a

nuevos orígenes no bien descritos o no contemplados aún en la bibliografía, no pudiendo obtenerse un diagnóstico positivo fiable. Se han realizado numerosos estudios al respecto de lo que parecen nuevas cepas con comportamientos diferentes a los ya establecidos o de resultados que no encajan con los parámetros conocidos, algunos de los cuales han permitido identificar nuevos agentes causales con fenotipos moleculares determinados.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

El material que ha sido objeto de este estudio son 5 muestras de tejido nervioso bovino, almacenadas en el Centro de Investigación de las Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, cuyo resultado, tras la aplicación de dos de las técnicas de diagnóstico de confirmación establecidas por la OIE, inmunohistoquímica y *Western blot*, no resultó concluyente. Todas ellas presentaban un muy avanzado estado de autólisis. La nomenclatura que se le aplicó a cada una, según la base de datos en la que habían sido registradas, fue 439, 440, 441, 442 y 447.

Los métodos utilizados para el diagnóstico de estas muestras fueron, por un lado, la técnica rápida *Western blot* de Prionics y, por otro, la de diferenciación de Bio-Rad, además de las cuatro técnicas de confirmación: inmunohistoquímica, *Western blot*, microscopía electrónica e inoculación en modelo murino. La histología se descartó por el estado autolítico de las muestras, al impedir obtener cualquier resultado a partir de ellas. Todas las técnicas fueron puestas a punto inicialmente con muestras procedentes de animales control sanos. Posteriormente, con muestras de animales afectados de Scrapie y EEB. Y, finalmente, con muestras autolíticas de ambas especies, antes de ser aplicadas a las muestras objeto de estudio.

1. Técnica rápida

1.1. *Prionics®-Check WESTERN test*

Es una de las técnicas rápidas que primero fue aplicada para el diagnóstico de EEB aunque, posteriormente, en algunos casos, fue sustituida por la de PrioSTRIPS® como técnica de diagnóstico de primera elección por su mayor rapidez y comodidad. Esta técnica ya ha sido descrita en el capítulo de Revisión Bibliográfica y consiste en detectar la presencia o ausencia de las bandas glicosiladas.

El protocolo a seguir se detalla a continuación. Se talla aproximadamente 0.45-0.75 gr de tejido y se realiza una homogeneización en el buffer adecuado, tras la cual cada muestra es transferida a tubos Beckman para ser sometida a una ultracentrifugación (1127g, durante 5 minutos a 10°C). Posteriormente, las muestras son digeridas con la proteinasa K (Roche, Suiza) en la placa de digestión (durante 45 minutos a 51°C). La reacción se interrumpe con solución de bloqueo y las muestras son preparadas para la electroforesis mediante la adición del buffer correspondiente y una incubación de la placa (durante 10 minutos a 105°C). Los marcadores utilizados en la técnica son la solución estándar de peso molecular y el control del kit. Como controles, una muestra de EEB y una de Scrapie. Las muestras son cargadas en el gel y la electroforesis se realiza a 200V durante 45 minutos. Las membranas PVDF son previamente equilibradas (con metanol, agua destilada y buffer de transferencia) antes de la transferencia (150V durante 1 hora). El bloqueo de la reacción se lleva a cabo mediante la inmersión de las membranas en buffer de bloqueo (durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación). Posteriormente, se realiza la incubación del anticuerpo primario (6H4, provisto en el kit comercial; durante 12-18 horas a 4°C en agitación). Tras los lavados correspondientes, se procede a la incubación con el anticuerpo secundario (1:5000) junto con la streptavidina (1:2000, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación) y, tras nuevos lavados, la membrana es incubada en buffer de luminiscencia (5 minutos) y con CDP-Star antes de ser revelada (Fig. 1).

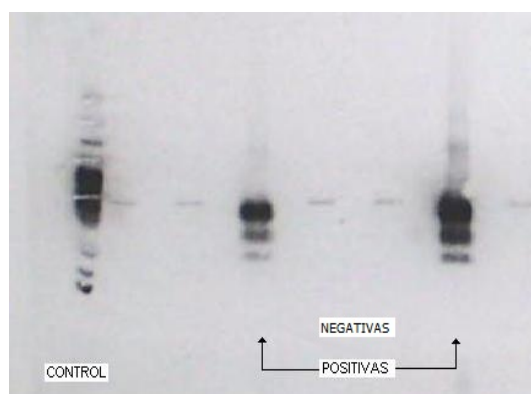


Fig. 1: Ejemplo de imagen obtenida a partir de muestras positivas y negativas tras la aplicación del *Prionics*®-Check WESTERN test (European Commission, 1999).

2. Inmunohistoquímica

Debido al estado de avanzada autólisis que presentan las muestras, la técnica inmunohistoquímica utilizada en el diagnóstico de rutina en el laboratorio se ha modificado parcialmente según el protocolo específico para muestras que se presentan en ese estado, publicado por Monleón *et al.* (2003).

Brevemente, un hisopo de cada muestra es diluido y homogeneizado en 1 ml de PBS. A partir de éste, se extrae una alícuota de 40 µl, junto con posteriores diluciones decimales seriadas, y se extiende en el portaobjetos, obteniéndose 3 frotis en gradiente de concentración. Posteriormente, se incuban durante toda la noche (56-57°C), antes de ser sometidos a la técnica inmunohistoquímica, para evitar que los frotis se despeguen.

Realizados los frotis de las muestras autolíticas, el protocolo de la técnica inmunohistoquímica incluye un pretratamiento previo similar al utilizado en la inmunohistoquímica convencional para el desenmascaramiento de epítomos, que consiste en inmersión en ácido fórmico al 98% (15 minutos), digestión con proteinasa K (Roche, Suiza; 15 minutos a 37°C) y autoclavado hidratado en buffer citrato (130°C) para aumentar la inmunoreactividad de la PrPsc (Kitamoto *et al.*, 1992). Como anticuerpos primarios se utilizan el L42 (1:500, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), P4 (1/160, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania), R145 (1/500, DEFRA, Reino Unido) y F89 (1/2000, VMRD, Inc, Estados Unidos) durante una incubación de 30 minutos. La visualización de la reacción se lleva a cabo mediante el sistema EnVision (DAKO, Dinamarca; durante 30 minutos) y utilizando como cromógeno el DAB (DAKO, Dinamarca).

Debido a la escasa detección de PrPsc mediante la aplicación del protocolo descrito, las muestras son sometidas de forma adicional a un protocolo con el objetivo de amplificar en mayor medida la señal. Dicho protocolo es similar al anterior, pero con la introducción de un *linker* (EnVision™ Flex Mouse, DAKO,

Dinamarca), capaz de amplificar la unión del anticuerpo y la consiguiente señal. Así, en la técnica inmunohistoquímica antes descrita, se incluye una incubación con el *linker* (durante 15 minutos) tras la del anticuerpo primario y se utiliza un sistema de visualización específico (EnVision™ FLEX/HRP, DAKO, Dinamarca; durante 30 minutos) antes de la incubación con el cromógeno DAB.

3. *Western blot*

El *Western blot* utilizado es el denominado *SAF-Immunoblot* (Inmunotransferencia SAF) establecido por la OIE como técnica de confirmación. El objetivo de la técnica es determinar el perfil de glicosilación tras un proceso de purificación y concentración de la muestra.

No existe un protocolo común pero, como ya se ha indicado, todos se basan en el publicado por la OIE (Stack, 2004). A pesar de que la técnica del *Western blot* es similar en todos ellos, lo que les diferencia principalmente es el protocolo previo de concentración de la muestra realizado antes de la electroforesis con el objetivo de aumentar la sensibilidad del *Western blot* para la detección de PrPsc.

Para la preparación de la muestra se utilizan 1-1,5 gr de tejido que se homogeneiza en 5 ml de tampón de lisis (BLB) junto a 10 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF, 100 mM) y 10 µl de N-etil-maleimida (NEM, 100 mM). El homogeneizado obtenido se transfiere hasta alcanzar un volumen de 10 ml. A continuación, se realiza un proceso de sonicación (50-60 Hz durante 1 minuto) y las muestras se transfieren a los viales específicos de la ultracentrífuga. Después de una centrifugación (20.000g, durante 30 minutos a 10°C), para eliminar los restos celulares presentes en la solución, el *pellet* es desechado y el sobrenadante es transferido a nuevos viales de ultracentrífuga adicionando BLB y es centrifugado de nuevo (177.000g, durante 2 horas y 15 minutos a 10°C). El *pellet* que se obtiene se resuspende en 1.5 ml de agua destilada con 25 µl de 1 M Tris/HCl (pH 7.4) y se incuba (a 37°C durante 15 minutos y en agitación). Tras la

adición a la solución de 3 ml de 15% KI-HSB, se realiza una incubación de 30 minutos en las mismas condiciones anteriores de temperatura y agitación. De la misma manera que en los pasos anteriores, las muestras son sometidas a una nueva incubación de 1 hora tras la adición de 1 mg/ml de proteinasa K (Roche, Suiza). Previamente a la última centrifugación, se añaden 4,5 ml de KI-HSB al 10% y se transfiere la solución a un nuevo tubo de ultracentrífuga en el que se depositan 2 ml de sacarosa al 20%. Tras llenar el tubo con KI-HSB al 10%, se vuelve a centrifugar (189.000g, durante 1 hora a 10°C). El sobrenadante es desechado y el *pellet* obtenido se resuspende en 40 µl de tampón de muestra. El proceso de concentración de las muestras finaliza con una breve sonicación (50-60 Hz durante 30 segundos) y una corta centrifugación para concentrar la muestra en el fondo del tubo.

Una vez procesada la muestra, la técnica de *Western blot* consiste en una electroforesis en gel de poliacrilamida y la consiguiente inmunotransferencia. Los geles, previamente preparados, consisten en un gel de separación al que, tras una hora para permitir que se polimerice, se añade el gel de concentración. Este gel de concentración, similar al de separación en su composición, se deja secar 5 minutos hasta que polimerice completamente. Las muestras, previamente preparadas, son incubadas (durante 5 minutos a 95°C) y cargadas en el gel (30µl). La electroforesis se realiza a 100V hasta que las muestras alcanzan el gel de separación, entonces se continúa a 200V durante unos 30-40 minutos. En cuanto a la transferencia, ésta se realiza en cámara semiseca, donde entra en contacto el gel con una membrana immobilon-P-Transferencia (previamente equilibrada durante 5 minutos en metanol y tampón de transferencia). Para la transferencia se requiere la colocación de papel *Whatman*. La corriente aplicada es 15V durante 50 minutos. Tras este tiempo, la membrana se bloquea con la solución de bloqueo (durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación) y se incuba con el anticuerpo primario (6H4, 1:2500; Prionics, Zurich, Suiza) durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras 3 lavados con PBS/Tween, se incuba con el conjugado GAM-AP (1/2000, Jackson Immunoresearch, Reino Unido; durante 1 hora en

agitación). Se repite el ciclo de lavados y la membrana se incuba con tampón de ensayo durante 2 minutos en las mismas condiciones. Para visualizar la unión de los anticuerpos, se añade el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Tropix, Inc, Estados Unidos) durante 5 minutos antes del revelado de la membrana.

Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la técnica y solventar los problemas de detección de la PrPsc presente en las muestras, se añade un protocolo de purificación y concentración previo a la técnica de *Western blot* que se acaba de detallar, elaborado en base a varios protocolos previamente descritos para tal fin (Hilmert y Diringer, 1984; Hope *et al.*, 1986; Stack *et al.*, 1995), con el propósito de asegurar una concentración suficiente en la muestra para su detección.

La técnica de concentración finalmente aplicada consiste en una homogeneización del encéfalo en 45 ml de sarcosil al 10% (pH 7,4 ajustado con NaH₂PO₄) durante 30 segundos en el homogeneizador. La solución se deja reposar (durante 30 minutos a temperatura ambiente) y, a continuación, se añaden 3 gotas de N-octanol para eliminar la espuma. Posteriormente, se realiza una centrifugación (22.000 g, durante 30 minutos), eliminándose el sobrenadante y diluyendo el *pellet* en una solución de 1% sarcosil y 10% NaCl. El mismo proceso se repite a continuación: una centrifugación (215.000g, durante 30 minutos) tras la cual se elimina de nuevo el sobrenadante y se diluye el *pellet* en 1 ml de la misma solución de 1% sarcosil y 10% NaCl en la que será incubado (durante 1 hora a 37°C y en agitación). La solución resultante se transfiere a un vial adecuado y se centrifuga nuevamente (9100 g, durante 15 minutos). El *pellet* que se obtiene es diluido en el mismo buffer y digerido con 5µg de proteinasa K (Roche, Suiza) durante una incubación de 2 horas a 37°C. Una centrifugación (9100 g, durante 5 minutos) se realiza como último paso antes de obtener el *pellet*, sobre el que se aplicarán los protocolos anteriormente descritos sobre preparación de la muestra (concentración y purificación), electroforesis e inmunotransferencia.

3.1. *Western blot* de diferenciación de Bio-Rad (Ref.: 35 51177)

Es una adaptación de la técnica de *Western blot* antes descrita que permite diferenciar si el agente causal es el de la EEB, del Scrapie o del Scrapie atípico, mediante la comparación de la altura, intensidad y localización de las bandas glicosiladas y su presencia/ausencia con determinados anticuerpos en relación con el perfil característico que presenta cada uno. Se basa en las diferencias de sensibilidad a la proteólisis de la región N-terminal de la PrPsc en función del agente causal que se trate. Así, dependiendo de las condiciones de proteólisis, esta región de la PrPsc puede ser digerida en el caso de la EEB, pero persistir en los casos de Scrapie clásico (Tabla 1). Por esta razón, no es una técnica de confirmación, pero es de gran utilidad para la caracterización de agentes causales, que es para lo que fue aplicada en este estudio. La técnica incluye dos protocolos de purificación, que difieren en la concentración de proteinasa K a la que se expone la muestra (*LOW* y *HIGH*), y se combina con otros dos protocolos de detección mediante *Western blot* usando dos anticuerpos monoclonales (*TEST* y *CONTROL*), que reconocen dos regiones proteicas distintas.

Para la realización de esta técnica se obtienen 0.35 gr de tejido nervioso procedente de la muestra, preferentemente del obex, que son homogeneizados con un buffer adecuado. Además, se utilizan un control de EEB y otro de Scrapie clásico que serán sometidos al mismo protocolo posterior que las muestras de estudio. La solución resultante tras la homogeneización es transferida (por duplicado, 20% peso/volumen) y se digiere con dos soluciones de concentraciones diferentes de proteinasa K. Una de las digestiones se realiza con una solución compuesta de 40 μ l/ml y otra menos concentrada de 2 μ l/ml en la misma solución (1:20 de la solución más concentrada). Tras la incubación de dicha mezcla (durante 30 minutos a 37°C), se lleva a cabo la precipitación de PrPsc mediante la adición del reactivo adecuado. Tras una nueva centrifugación (15000g, durante 7 minutos a 20°C), el sobrenadante es desechado y el *pellet* es diluido en solución Laemmli e incubado (durante 5 minutos a temperatura

ambiente). Tras una nueva incubación del *pellet* resuspendido (durante 5 minutos a 100°C +/- 5°C), las muestras se someten a centrifugación (15000g, durante 15 minutos a 20°C) para seleccionar el sobrenadante que será cargado en el gel y desechar el *pellet*.

Para la electroforesis (200V durante 50 minutos a temperatura ambiente) se cargan las muestras por duplicado (dos pocillos por muestra con mayor y menor concentración de digestión respectivamente) junto a los correspondientes marcadores. Los geles también son por duplicado, pues posteriormente las membranas son incubadas con dos diferentes anticuerpos primarios. Previamente a la transferencia (115V durante 60 minutos), las membranas son equilibradas mediante lavados con etanol, agua destilada y tampón de transferencia (TRIS/CAPS-Etanol al 1%). Posteriormente, la membrana transferida es de nuevo equilibrada (con PBS, etanol y agua destilada, durante 5 minutos). La primera incubación a la que es sometida la membrana son 30 minutos en agitación moderada en solución de saturación (1/10 en solución de lavado) y, después, con el anticuerpo primario suministrado comercialmente (1/10, durante 30 minutos a temperatura ambiente y con agitación moderada). Cada una de las dos membranas se incuba con un anticuerpo primario diferente (*CONTROL* y *TEST*), que reconocen la región central de la proteína PrP^{sc} y la región del octapéptido de la proteína, respectivamente. La membrana, entonces, es incubada con el anticuerpo secundario (1/10, durante 20 minutos a temperatura ambiente y agitación moderada). Tras los lavados, se lleva a cabo el revelado (Amersham Film ECL) con el sustrato ECL (Amersham, Reino Unido; 15 minutos).

Tabla 1: Diagrama esquemático de la clasificación de las muestras a partir de los resultados obtenidos mediante la técnica del *Western blot* de diferenciación de Bio-Rad.

| Condiciones de detección | Condiciones de purificación | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------|------|---------|------|-----|------|------------------------|------|
| | Negativo | | Scrapie | | EEB | | pK sensible (atípicas) | |
| | LOW | HIGH | LOW | HIGH | LOW | HIGH | LOW | HIGH |
| TEST | - | - | + | + | + | - | + | - |
| CONTROL | - | - | + | + | + | + | + | - |

Para tratar de aumentar la sensibilidad de la técnica y solventar los posibles problemas de concentración de PrPsc en las muestras, se añade previamente el mismo protocolo de purificación y concentración de PrPsc que fue incluido anteriormente a la aplicación del *Western blot* de confirmación.

4. Microscopía electrónica

La técnica de microscopía electrónica empleada para la observación de fibrillas se basa en los protocolos descritos por Hilmert y Diringer (1984) y Narang y Perry (1990). Se elige una combinación de ambos con el fin de lograr una mayor eficacia y sensibilidad en las muestras con baja concentración de PrPsc.

Debido a la dificultad de evidenciar las fibrillas, se lleva a cabo, previo a la técnica de microscopía electrónica, el mismo protocolo de purificación y concentración de PrPsc realizado previamente a las técnicas anteriores.

Tras este protocolo de concentración, la muestra es recogida en las rejillas (*Carbon-formvar 200-mesh grids*, Ted Pella, Inc, Estados Unidos) por medio del método *touch grid* descrito por Narang y Perry (1990). Posteriormente, las rejillas se sumergen en SDS al 1% durante 1 minuto y son lavadas con agua destilada durante 5 minutos. Para su visualización, se utiliza la tinción con ácido potásico

fosfotúngstico (pH 6,6 al 2%), tras la cual se valoran las muestras con el microscopio electrónico de transmisión.

Adicionalmente, para confirmar que las fibrillas observadas están asociadas a la enfermedad, se aplica una técnica inmunohistoquímica que utiliza el oro coloidal para marcar la PrPsc constituyente de las fibrillas. Esta técnica de microscopía electrónica con oro coloidal, basada en la descrita por Merz *et al.* (1987), se detalla a continuación.

Partiendo de las muestras procesadas para visualización con el microscopio electrónico convencional, las muestras son capturadas también mediante la técnica de *touch grid*. Las rejillas son lavadas en agua destilada (4x) e incubadas en albúmina sérica bovina, BSA (0.1%, durante 10 minutos), para bloquear señales inespecíficas. Posteriormente, el anticuerpo primario diluido en BSA se incuba durante toda la noche a 4° C (L42, 1/500; R-Biopharm, Darmstadt, Alemania). Tras 4 lavados con PBS (durante 8 minutos), se lleva a cabo la incubación con el anticuerpo secundario (*goat anti-mouse immunoglobulin, 10 nm colloidal gold-conjugated*, Ted Pella, Inc, Estados Unidos) a dilución 1/100 en BSA (durante 1 hora). Por último, se realizan varios lavados en PBS (4x, durante 8 minutos) y en agua destilada (2x) antes de la tinción de la muestra con ácido fosfotúngstico al 2% (ph 7,2).

En ambos casos, el microscopio utilizado para la visualización de las fibrillas es un Jeol JEM-1200 EX II aplicando un voltaje de 80.000 voltios.

5. Bioensayo en ratón

Para llevar a cabo el bioensayo, las 5 muestras son inoculadas en ratones. La infección experimental se llevó a cabo en Alemania, concretamente en *Micromun Privates Institut für Mikrobiologische Forschung GmbH* (Greifswald, Alemania), debido a que entonces no se disponía de las instalaciones necesarias que

cumplieran con los niveles de seguridad imprescindibles y exigidos por la legislación vigente para efectuar en el Centro todo el ensayo. En *Micromum* es donde se realizan tanto las inoculaciones como todo el seguimiento clínico, eutanasia, toma de muestras y valoración mediante técnicas rápidas.

La línea transgénica de TgbovXV empleada fue generada, como se ha adelantado en el capítulo de Revisión Bibliográfica, por Buschmann *et al.* (2000) y se caracteriza por ser ratones transgénicos que sobreexpresan el gen bovino de PrP (Buschmann y Groschup, 2005). Concretamente, esta línea transgénica ha sido realizada insertando el transgen bovino PrP (6OR) por microinyección mediante un vector transgénico phgPrP, logrando un índice de expresión 8 veces superior al *wild-type*. Lo que se consigue así es un aumento significativo de la sensibilidad al agente causal de la EEB y una disminución del tiempo de incubación de la enfermedad tras la inoculación experimental.

Anteriormente a la inoculación, se realizaron varias pruebas en los inóculos para comprobar su toxicidad y la contaminación microbiana, con el objetivo de optimizar el éxito de la inoculación. Se llevaron a cabo inoculaciones en un reducido número de ratones para comprobar dichas variables en los inóculos correspondientes a las muestras objeto de estudio y reducir así su influencia sobre la supervivencia de los animales inoculados.

5.1. Pruebas preliminares

5.1.1. Contaminación microbiana.

La contaminación microbiana se valoró realizando el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc) en las placas de agar Luria sembradas previamente con el inóculo. Para ello, se llevó a cabo una siembra en placa de 125 µl de cada inóculo durante 48 horas a 37°C. Si transcurrido este tiempo, el resultado era mayor de 3 ufc, los inóculos se sometían a un proceso basado en dos incubaciones (durante 15 min a 70°C), con un intervalo de 24 horas entre ambas, previo a la inoculación en el animal.

5.1.2. Toxicidad.

Para valorar la toxicidad presente en los inóculos de las muestras del estudio, se inocularon 20 µl por vía intraperitoneal junto con 100 µl por vía intracerebral de cada muestra a un número limitado de ratones (animales/muestra: 54/439, 45/440, 41/441, 38/442, 51/447). Estos animales, aislados en las jaulas *UNI-Protect-Laminar-Air-Stream Board* que aseguran un ambiente libre de gérmenes, se mantuvieron durante diez días, con inspección de los animales dos veces al día. Si tras 10 días post-infección la mortalidad de los ratones era de más del 20%, la toxicidad se consideraba inaceptable, por lo que se probaron sucesivas diluciones de cada muestra hasta alcanzar una toxicidad tolerable.

Al mismo tiempo, la toxicidad de los inóculos se valoró también comprobando la existencia de efectos citotóxicos en cultivos monocapa de células Vero con la ayuda de un microscopio inverso.

5.2. Inoculación en ratón

Un número total de 229 ratones Tgbov XV fueron inoculados intracerebral e intraperitonealmente con 20 µl y 100 µl del inóculo, respectivamente. La concentración de cada uno de ellos varió ostensiblemente debido a los diferentes valores obtenidos en los estudios de toxicidad y contaminación microbiana, dependiendo de las diluciones que fueron necesarias en cada caso.

Tras la inoculación y hasta la muerte o sacrificio de los animales, los ratones se mantuvieron estabulados en jaulas Macrolon (tipo III), con unas condiciones ambientales controladas de temperatura (20-23°C) y humedad (50-60%) y con ciclo de día/noche (12 h/ciclo). Además, los animales se mantuvieron en condiciones SPF, esterilizando todo el material que entraba en contacto con los animales: material de anidación ("Allspan", INTRAVET), pienso (V1126-000, ssniff M-extrudet Zucht) y agua de bebida.

Durante el periodo de incubación, los animales fueron valorados clínicamente una vez al día durante el primer mes y dos veces por semana desde el día 31 al 700, con el fin de detectar precozmente cualquier síntoma clínico. Cuando esto ocurría, se recuperaba la frecuencia del examen clínico (1 vez/día) de todos los animales de esa jaula, además de separar a los animales que presentaban esos signos clínicos siguiendo el protocolo ya aplicado por Cordier *et al.* (2006). Aparte, de modo rutinario, se inspeccionaban diversos parámetros relacionados con la función vital para aplicar, en caso de que fuera necesario, los criterios de punto final establecidos por los expertos en bienestar animal de la empresa alemana.

El tiempo de incubación máximo que se estableció para la aparición de los síntomas clínicos fue de 24 meses, tras los cuales los animales fueron sacrificados. De todas formas, antes de ese tiempo, la mayoría de los animales murieron por causas naturales y otros fueron sometidos a eutanasia (CO₂) al cumplir con uno o más criterios de punto final.

Tras la muerte de los animales, de forma natural o por eutanasia, se extrajo el encéfalo completo. Un hemiencéfalo se mantuvo en fresco y fue utilizado para la ejecución de las técnicas rápidas en las instalaciones de *Micromum: BetaPrion BSE EIA Test Kit de Roboscreen* y Kit de detección de *Bio-Rad Platelia BSE*; y el otro hemiencéfalo, fijado en formol por inmersión (10%), fue enviado, junto a toda la información relativa a cada animal, para la realización del resto de pruebas de detección de PrP^{sc} y posteriores estudios al Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

Las técnicas rápidas a las que fueron sometidos todos los encéfalos murinos en Alemania fueron las siguientes:

- *BetaPrion BSE EIA Test Kit de Roboscreen*. La técnica, ya descrita en el capítulo de Revisión Bibliográfica, consiste en una homogeneización de la

muestra procedente del encéfalo de los ratones inoculados y una posterior digestión con proteinasa K (durante 15 minutos a 37°C en agitación) para eliminar la PrPc. Tras una incubación con la solución de precipitación (durante 15 minutos), una centrifugación (16000g, durante 5 minutos) y la solubilización de la PrPsc (durante 5 minutos a 99°C), la proteína resistente es detectada mediante la incubación con dos anticuerpos monoclonales (durante 45 minutos). El anticuerpo secundario utilizado es conjugado con peroxidasa, uniéndose al sustrato colorimétrico (durante 10 minutos en oscuridad) añadido posteriormente. Tras el bloqueo de la reacción, la absorbancia se mide a una longitud de onda entre 450nm y 620nm.

- Bio-Rad PLATELIA BSE Detection Kit. Esta técnica fue empleada como alternativa para valorar las muestras que resultaban positivas en la técnica anterior. Es un enzimoimmunoensayo que consiste en una homogeneización del tejido que, tras la digestión con proteinasa K, es incubado a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente, se realiza una centrifugación (20000g, durante 5 minutos) y el *pellet* resuspendido es nuevamente incubado (a 100°C durante 5 minutos), para después mezclarlo vigorosamente. Entonces, la muestra es diluida de nuevo con el buffer adecuado y preparada para el proceso del ELISA que comprende: 3 pasos de incubación (a 37°C, a 4°C y el último paso en oscuridad a temperatura ambiente) con dos anticuerpos (uno de captura y otro de detección), 2 ciclos de lavado y la lectura final de los resultados que se lleva a cabo en un fotómetro a una longitud de onda entre 450 nm y 620nm.

Con respecto a la parte del encéfalo que se envía para el resto de pruebas diagnósticas, éste se destina para las técnicas de confirmación que a continuación se citan, principalmente para la realización de técnicas inmunohistoquímicas, aunque también para realizar técnicas de microscopía electrónica y de microscopía confocal.

Así, cada encéfalo es tallado en 5 secciones siguiendo el protocolo especificado en Barr *et al.* (2004, Fig. 2) antes de aplicarse las técnicas de detección de la PrPsc. En algunos de los animales, las secciones fueron 6, al ser posible obtener un corte adicional más caudal.

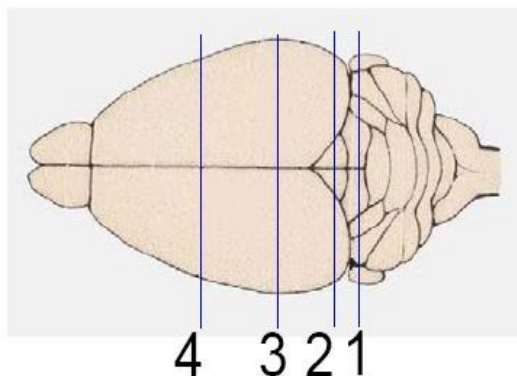


Fig. 2: Imagen detallada de los cortes realizados en cada uno de los animales del modelo murino, siguiendo el protocolo descrito en Barr *et al.* (2004).

Las secciones de cada hemiencéfalo se incluyen en parafina y se realizan cortes de 4-5 μm para la posterior aplicación de los protocolos inmunohistoquímicos.

5.3. Inmunohistoquímica

La técnica inmunohistoquímica que finalmente se ha aplicado en el estudio de las muestras murinas es algo diferente a la descrita y aplicada anteriormente en las muestras bovinas, puesto que ha sido necesario adaptarla y realizar diversas modificaciones con el fin de disminuir el *background* (fondo), que era el principal problema en el tejido procedente de encéfalos fijados murinos.

En primer lugar, se lleva a cabo la desparafinación de la muestra (xilol, etanol 99°, etanol 96°, etanol 70° y H₂O_d). Después, se realiza un pretratamiento de la muestra, similar al aplicado en el protocolo utilizado sobre muestras bovinas, para el desenmascaramiento de los epítomos, que consiste en ácido fórmico al 98% (durante 5 minutos), digestión con proteinasa K (4 $\mu\text{gr}/\text{ml}$, Roche, Suiza; durante 15 minutos a 37°C) y autoclavado hidratado con buffer citrato (130°C).

Tras el bloqueo de la peroxidasa endógena (al 0,03% durante 8 minutos) y los correspondientes lavados con TBS, se realiza la incubación con el anticuerpo primario (durante 30 minutos a temperatura ambiente). Estos anticuerpos primarios utilizados son monoclonales y específicos para PrPsc: 6H4 (1/100, Prionics, Zurich, Suiza), R145 (1/100, DEFRA, Reino Unido) y F89 (0.5 µg/ml VMRD, Inc, Estados Unidos). El sistema de visualización se basa en la incubación (durante 30 minutos a temperatura ambiente) con el polímero marcado (Envision +TM Peroxidase, Mouse DAKO), utilizando como cromógeno el DAB plus (DAKO, Dinamarca; al 30% durante 5 minutos a temperatura ambiente). Por último, se procede a una tinción con hematoxilina de unos 30-40 segundos y un lavado en agua corriente (durante 5 minutos). Tras la debida deshidratación de la muestra (etanol 70°, etanol 96°, etanol 99° y xilol), las muestras son montadas con DPX y sometidas a visualización mediante el microscopio óptico.

Al igual que en el caso de la inmunohistoquímica en tejido bovino, con objeto de aumentar la sensibilidad de la técnica, se prueba el mismo protocolo antes descrito para las muestras de origen bovino basado en la adición de una incubación con el *linker*.

5.4. Inmunohistoquímica ultrasensible

Con el fin de lograr disminuir aún más el *background* y aumentar la sensibilidad en la medida de lo posible, se ha puesto a punto una inmunohistoquímica que aumenta la sensibilidad de la técnica, especialmente, en muestras caracterizadas por baja concentración de PrPsc.

En dicha técnica, el desparafinado y pretratamiento previo de las muestras es idéntico al descrito en la inmunohistoquímica convencional. La diferencia consiste en las posteriores incubaciones que se llevan a cabo tras este pretratamiento de la muestra, siguiendo las instrucciones del Kit comercial que acompaña a los reactivos (*Catalyzed Signal Amplification [CSA] System*, DAKO). Se

procede a una incubación con avidina (10 minutos), seguida de una con biotina (10 minutos), peróxido de hidrógeno (5 minutos) y bloqueante de la proteína (5 minutos). Para marcar la PrPsc se incuba (15 minutos) con el anticuerpo primario 6H4 (1/100; Prionics, Zurich, Suiza), R145 (1/100; DEFRA, Reino Unido) y P4 (1/40; Bio-pharm, Darmstadt, Alemania) y, para aumentar más la señal, se adiciona el *linker* (15 minutos). Posteriormente, las muestras son incubadas con el complejo estreptavidina-biotina (15 minutos) y, a continuación, con el amplificador (15 minutos) y la estreptavidina-peroxidasa (15 minutos) antes de añadir el sustrato-cromógeno (3 a 5 minutos). Entre todas las incubaciones se lava la muestra con TBST, excepto antes de la incubación con el anticuerpo primario. Tras una tinción con hematoxilina (30-40 segundos), se rehidrata la muestra (alcohol de 70°, 96°, 100°, 100°, xilol y xilol) y se procede al montaje en DPX antes de visualizarla al microscopio óptico.

5.5. Detección de SAF por microscopía electrónica y marcaje con oro coloidal

Tanto en el caso de la técnica de microscopía electrónica para la visualización de fibrillas SAF como en la de la IHQ con oro coloidal en la que se detecta PrPsc localizada en las fibrillas, el protocolo que se realiza es el mismo que el descrito para las muestras bovinas. Por ello, se lleva a cabo el protocolo de purificación-concentración de SAF descrito para las técnicas anteriores, previo a los protocolos de microscopía electrónica.

5.6. Microscopía confocal

La técnica de microscopía confocal se emplea para tratar de identificar el tipo celular implicado y relacionado con la PrPsc en determinadas áreas de algunas muestras, según se evidencia con la aplicación de los protocolos de inmunohistoquímica convencionales. El protocolo utilizado se basa en el empleado por Sarasa *et al.* (enviado para su publicación). La principal diferencia respecto a la inmunohistoquímica convencional es el uso de anticuerpos fluorescentes necesarios para la excitación con los láseres propios del microscopio

confocal.

Se parte de secciones de 50 μm recogidas en flotación. Un bloqueo de peroxidasa endógena (H_2O_2 al 1% durante 30 minutos) y una incubación de 3 horas en Tritón X-100 (al 0.1% en PBS), para permeabilizar el tejido, es necesaria tras 3 lavados de 5 minutos en PBS. Posteriormente, se lleva a cabo un pretratamiento de la muestra, similar al que se realiza en la inmunohistoquímica convencional, con el objetivo de desenmascarar los epítomos. Las secciones en flotación son incubadas en ácido fórmico al 98% (durante 15 minutos) y, posteriormente, para eliminar la PrPc, sometidas a una digestión (durante 15 minutos a 37°C) con proteinasa K (4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Roche, Suiza) y autoclavadas (130°C en agua destilada). La incubación con el anticuerpo primario, diluido en PBS-Tritón 0,1%, se realiza toda la noche en agitación a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados son dos monoclonales que reconocen específicamente la PrPsc (6H4, 1/500; Prionics, Zurich, Suiza y F89, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; VMRD, Inc, Estados Unidos) y uno policlonal que se une a la proteína GFAP que forma parte de la estructura de las células gliales, concretamente, de los astrocitos (1/500; DAKO, Dinamarca). Tras lavados en PBS (durante 10 minutos), las secciones son incubadas con IgG (biotinilado a 1/1000 en PBS, Invitrogen, Oregón, Estados Unidos) durante 1 hora para amplificar la señal de la unión con el anticuerpo primario. Después de un nuevo lavado, la incubación con el anticuerpo secundario se lleva a cabo durante 1 hora, en oscuridad, con una Alexa 594 conjugada con estreptavidina (1/200; Invitrogen, Oregón, Estados Unidos) y una Alexa 488 (1/200; Invitrogen, Oregón, Estados Unidos). Posteriormente a los dos últimos lavados con PBS (durante 10 minutos), las secciones son montadas con PBS-glicerina antes de ser observadas en el microscopio confocal.

La emisión de fluorescencia resulta de la excitación con los láseres de 488 nm y 594 nm con los que se toman imágenes seriadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging, Alemania) con objetivos de 10x (NA 0.3) y 20x (NA 0.5).

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Técnica rápida

La primera técnica de diagnóstico aplicada a las muestras procedentes de tejido nervioso bovino fue la técnica rápida, tal y como se hace de rutina en el sistema de la vigilancia activa. Según el resultado obtenido con la técnica aplicada, se seleccionaron las muestras incluidas en el estudio en base a los resultados no concluyentes que presentaban todas ellas.

Tras la aplicación del *Prionics®-Check WESTERN test*, se obtuvo un resultado que no permitía confirmar ni descartar la presencia de PrPsc. El diagnóstico era confuso porque se evidenciaba señal compatible con la presencia de PrPsc, pero el problema era que la intensidad, el tamaño y la posición de las bandas no se correspondían claramente con lo descrito. La razón podría haber sido que las muestras presentaban un avanzado estado de autólisis que podía influir en la distorsión de las bandas pero, por otro lado, el resultado tampoco coincidía con el patrón observado hasta entonces en muestras de similares características.

2. Técnicas de confirmación en las muestras autolíticas bovinas:

2.1. Inmunohistoquímica

En todos los frotis en los que se llevó a cabo el protocolo de inmunohistoquímica descrito para detectar la PrPsc, se observó, diseminada por toda la muestra, una tinción que parecía corresponder con depósitos de PrPsc (Fig. 3A, B, C, D, E). Dicha tinción no se encontró en ninguno de los frotis realizados a partir de muestras control procedentes de animales sanos (Fig. 3F).

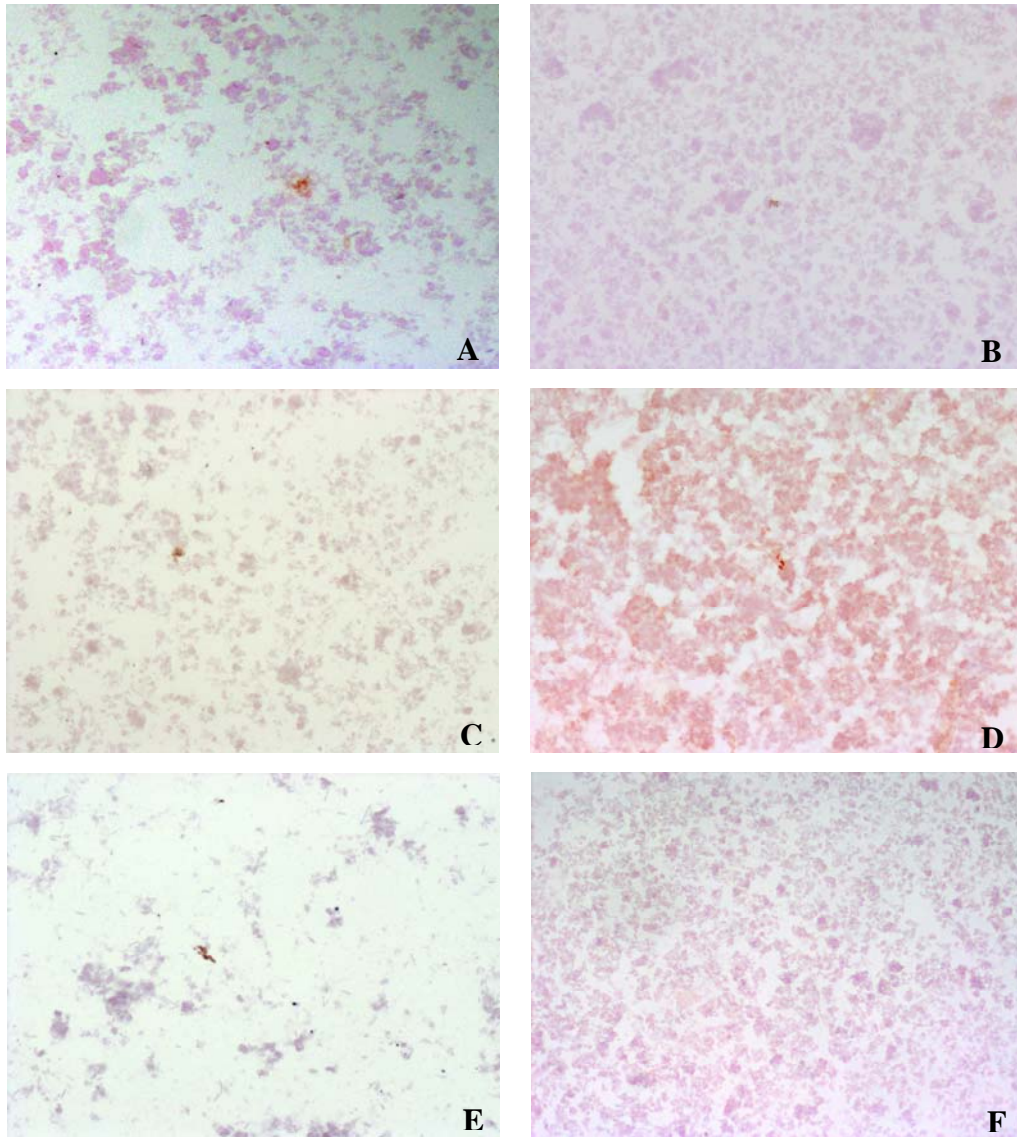


Fig. 3: Inmunomarcaje en frotis de la muestra bovina 439 (A), 440 (B), 441 (C), 442 (D) y 447 (E), así como de una muestra negativa procedente de un animal sano (F; 200x).

La positividad de la señal sobre todos los frotis procedentes de las muestras autolíticas bovinas se repitió con los 3 anticuerpos testados en el análisis inmunohistoquímico: L42, R145 y F89 (Fig. 4).

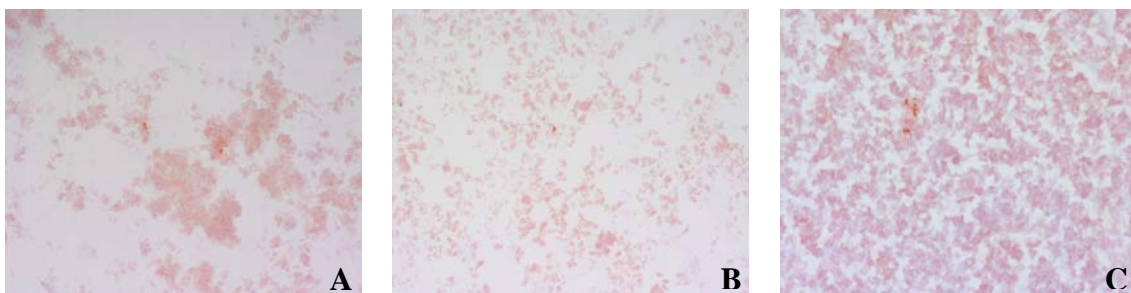


Fig. 4: Imagen comparativa de inmunomarcaje en frotis bovinos de la muestra 442 con el anticuerpo L42 (A), R145 (B) y F89 (C; 200x).

La inclusión del *linker* que fue añadido al protocolo inmunohistoquímico para amplificar la señal de PrPsc, no amplificó significativamente la señal (Fig. 5).

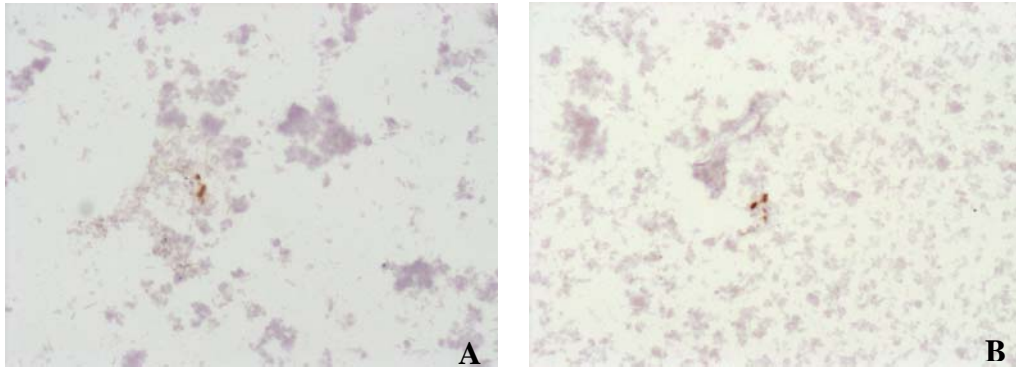


Fig. 5: Inmunomarcaje en un frotis bovino realizado a partir de la muestra 441 mediante una inmunohistoquímica convencional (A; 200x) y con la adición del *linker* (B; 200x).

2.2. *Western blot* de confirmación (OIE)

En todas las muestras incluidas en el estudio tras la aplicación del *Western blot* especificado por la OIE como técnica de confirmación (inmunotransferencia SAF), se llegó a observar una señal muy débil que clasificaba a las muestras nuevamente como no concluyentes. A pesar de todo el protocolo previo de purificación-concentración (tal y como se detalla en el capítulo de Material y Métodos) para concentrar más la PrPsc y aumentar la señal, no se logró una mejora significativa de la misma, por lo que el resultado resultó ser de nuevo no concluyente al no corresponderse con los patrones observables de forma rutinaria (Fig. 6).

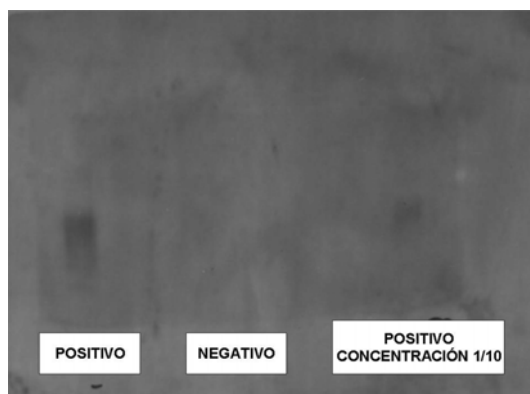


Fig. 6: Imagen obtenida mediante el *Western blot* de la OIE realizado en muestras autolíticas bovinas.

2.2.1. *Western blot* de diferenciación de Bio-Rad (Ref.: 35 51177)

Las muestras fueron sometidas al *Western blot* de diferenciación de Bio-Rad que distingue entre los agentes causales de la EEB, el Scrapie clásico y el Scrapie atípico con el fin de comprobar si los resultados no concluyentes podían deberse a una posible variación del agente causal.

La presencia de bandas no fue clara. Las muestras parecían negativas en ambas membranas, aunque se intuía ligeramente una presencia de inmunomarcaje, especialmente en la membrana incubada con el anticuerpo TEST, que reiteraba este resultado no concluyente de las técnicas anteriores. Incluso con el protocolo previo de purificación de la muestra, el resultado no concluyente no variaba de manera significativa (Fig. 7).

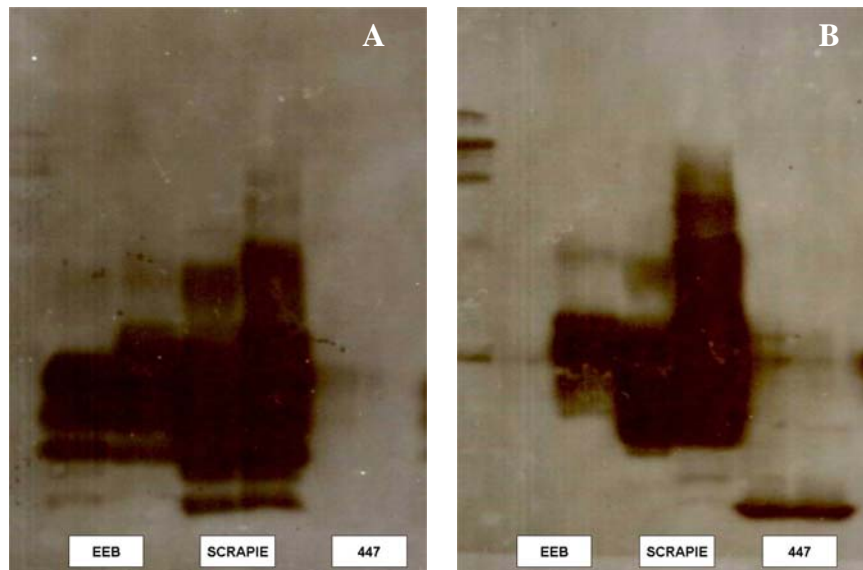


Fig. 7: Patrón de glicosilación de una muestra de EEB, otra de Scrapie y una de las muestras estudiadas (447) mediante el *Western blot* de diferenciación con el anticuerpo CONTROL (A) y TEST (B).

2.3. Microscopía electrónica

La técnica de microscopía electrónica ofreció resultados concluyentes en todas las muestras gracias a la aplicación del protocolo de purificación y concentración previo al *touch grid*. En todas las muestras se visualizaron unas fibrillas (Fig. 8) de morfología similar a las descritas en muestras de EEB por otros autores (Narang y Perry, 1990). Cabe mencionar que las fibrillas que se encontraban en todas ellas siempre estaban presentes en un número muy escaso y con una longitud ligeramente menor que la descrita en otros estudios.

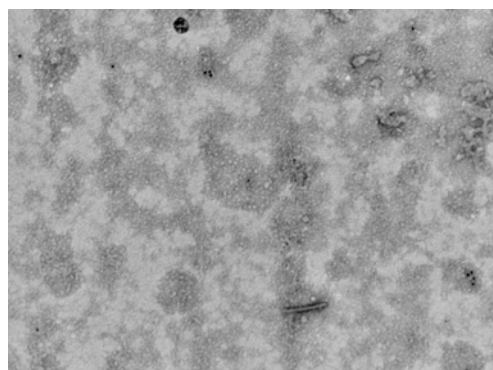


Fig. 8: Imagen de una fibrilla procedente de una de las muestras de tejido nervioso bovino objeto de este estudio procesada para su visualización con el microscopio electrónico (A; 60.000x).

Posteriormente, con la incorporación del oro coloidal como inmunomarcador de las SAF, se pudo demostrar que el anticuerpo reconocía de forma específica la PrPsc que formaba las fibrillas (Fig. 9). Su tamaño era el mismo que el encontrado anteriormente, corroborando que se trataban del mismo tipo de fibrillas.

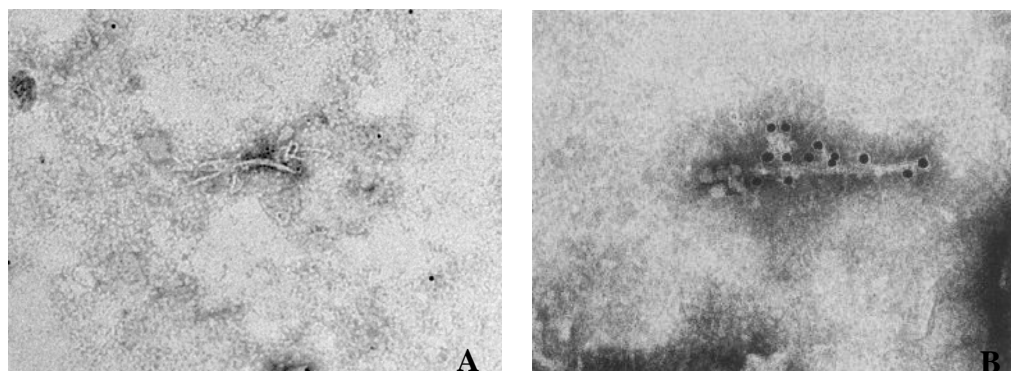


Fig. 9: Imagen de fibrillas procedentes de las muestras de tejido nervioso bovino objeto de este estudio procesadas para su visualización mediante la técnica de microscopía electrónica con oro coloidal a 120.000x (A); así como las visualizadas en el estudio de Merz *et al.* (1987; B: 143.000x).

Además del oro coloidal asociado a fibrillas, también se visualizaron partículas de oro pareadas (Fig. 10A) con una localización que no parecía aleatoria, sino específica, y que parecía corresponderse a dímeros de PrPsc similares a los descritos por Dourmashkin *et al.* (2004; Fig. 10B).

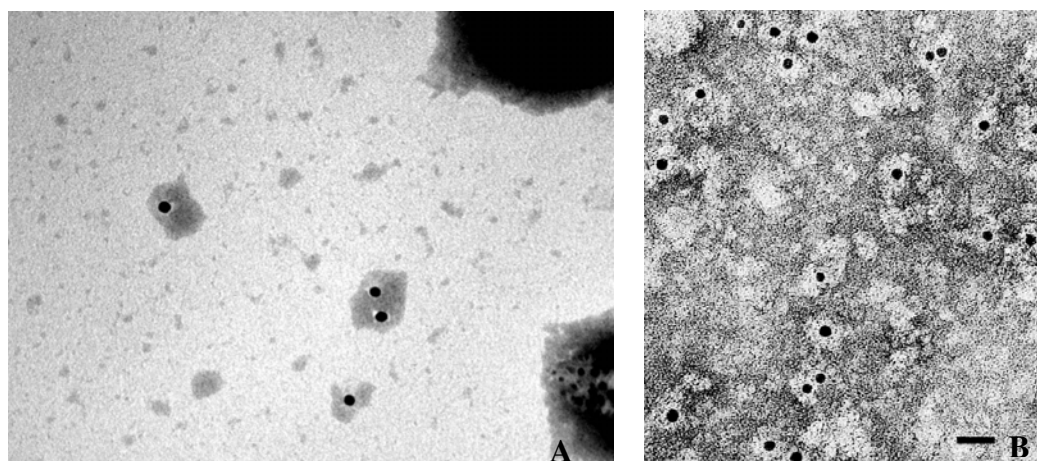


Fig. 10: Imagen comparativa de partículas de oro visualizadas en las muestras bovinas estudiadas (250.000x, diámetro de partículas de oro = 10 nm, 10A) y de las visualizadas en el estudio de Dourmashkin *et al.* (2004) con la misma técnica (416.000x, diámetro de partículas de oro = 5 nm, 10B).

3. Bioensayo en ratón

3.1. Pruebas preliminares

En las pruebas previamente realizadas a la inoculación experimental se evidenció que tanto la contaminación microbiana como la citotoxicidad eran muy elevadas. Como ambas podían comprometer el éxito posterior de la inoculación, se realizaron diversas pruebas con el objetivo de reducir sus efectos adversos.

3.1.1. Contaminación microbiana

Inicialmente, la contaminación microbiana era altísima, evidenciada por el gran número de unidades formadoras de colonias (ufc >1000) que crecían a partir de homogeneizados de todas las muestras cuando éstas eran sembradas en agar Luria. Un análisis realizado después de los dos tratamientos de calor (15 minutos a 70°C cada 24 horas), aplicado a diversas diluciones de los inóculos correspondientes a las muestras estudiadas, demostraron que el tratamiento térmico era suficiente para hacer disminuir e, incluso, hacer desaparecer completamente la contaminación (Tabla 2).

Tabla 2: Recuento de ufc en cada uno de los inóculos correspondientes a cada una de las muestras, a diferentes concentraciones probadas, antes y después del tratamiento térmico.

| Muestra | Concentración 10% | | Concentración 1.0% | | Concentración 0.1% | | Concentración 0.01% | |
|---------|-------------------|---------------|--------------------|---------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | Antes trat. | Después trat. | Antes trat. | Después trat. | Antes trat. | Después trat. | Antes trat. | Después trat. |
| 439 | >1000 | 3 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >1000 | - |
| 440 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >100 | - |
| 441 | >1000 | 1 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >1000 | - |
| 442 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >100 | - |
| 447 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >1000 | 0 | >100 | - |

3.1.2. Toxicidad

Los homogeneizados procedentes de todas las muestras objeto de este estudio presentaban también una alta toxicidad que resultaba inapropiada para el éxito de la inoculación experimental. Esta alta toxicidad era demostrada porque, tras una inoculación realizada en las mismas condiciones que la inoculación definitiva, un elevado número de animales moría entre las primeras 24 horas hasta los diez días post-inoculación. Este factor se intentó minimizar con el doble tratamiento de calor descrito para reducir la contaminación microbiana, pero la mejoría fue insuficiente porque sólo se incrementó 10 días la media de supervivencia de los animales (Tabla 3).

Debido a que el tratamiento térmico en este caso no tuvo el efecto deseado y la toxicidad no se eliminaba completamente, se tuvo que asumir la presencia de endotoxinas bacterianas en cada uno de los inóculos que iban a ser utilizados para la infección experimental. De hecho, se demostró, mediante las diferentes pruebas llevadas a cabo, que la única variable que parecía disminuir la toxicidad en los inóculos en todos los casos era una menor concentración del mismo.

Al mismo tiempo, el efecto citopático que estos homogeneizados producían en cultivos monocapa de células Vero se mostró también elevado (citotoxicidad). De la misma manera que antes, con sucesivas diluciones del inóculo, concretamente a partir de una concentración de 10^{-3} , la citotoxicidad se lograba reducir ostensiblemente (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto citopático demostrado sobre las células Vero en función de si habían recibido tratamiento térmico o no y en función de la concentración del inóculo.

| Muestra | Concentración 10% | | Concentración 10 ⁻¹ | | Concentración 10 ⁻² | | Concentración 10 ⁻³ | |
|---------|-------------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|
| | Antes trat. | Después trat. | Antes trat. | Después trat. | Antes trat. | Después trat. | Antes trat. | Después trat. |
| 439 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 440 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 441 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 442 | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 447 | - | - | - | - | - | - | + | + |

"-" = células no intactas (tóxico) y "+" = células intactas (dilución no tóxica del homogeneizado del encéfalo para las células)

Como el tratamiento térmico no era suficiente para reducir la toxicidad, se optó por aumentar adicionalmente la dilución de las muestras en los inóculos con el fin de disminuir los valores de esta variable y así aumentar las probabilidades de éxito en la inoculación. La variabilidad en la dilución final de cada inóculo vino determinada por el efecto que causaba cada concentración en la supervivencia de un número reducido de animales inoculados, buscando la menor dilución posible que pudiera asegurar el éxito en el desarrollo de la infección experimental. En estos estudios, también se realizó un segundo tratamiento de calor para asegurar la supervivencia de los animales mediante la eliminación de la contaminación microbiana.

Por tanto, los resultados conjuntos, obtenidos a partir de los estudios de contaminación microbiana y toxicidad, fueron los que determinaron la concentración elegida en cada una de las muestras para la inoculación final. La dilución final en cada una resultó ser de: 1,25% para la muestra 439, 5% para la 440, 441, y 442 y 4% para la 447 (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto de cada dilución del inóculo testada para cada una de las muestras sobre la mortalidad en 48 horas y supervivencia tras 10 días en ratones inoculados para los estudios preliminares realizados.

| Muestra | Concentración | Número de ratones inoculados | Número de ratones muertos en 48 horas | Número de ratones vivos tras 10 días |
|---------|---------------|------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 439 | 10% | 5 | 5 | 0 |
| | 5.0%* | 5 | 5 | 0 |
| | 2.5%* | 7 | 5 | 2 |
| | 1.25%* | 10 | 0 | 8 |
| | 1.25%* | 15 | 1 | 14 |
| | 1.25%* | 12 | 0 | 12 |
| 440 | 10% | 6 | 2 | 4 |
| | 5.0%* | 19 | 3 | 11 |
| | 5.0%* | 20 | 2 | 18 |
| 441 | 10%* | 7 | 4 | 3 |
| | 5.0% | 25 | 6 | 17 |
| | 5.0%* | 9 | 2 | 7 |
| 442 | 10% | 7 | 7 | 0 |
| | 10%* | 10 | 4 | 6 |
| | 5.0% | 10 | 2 | 8 |
| | 5.0%* | 11 | 0 | 11 |
| 447 | 10% | 7 | 7 | 0 |
| | 10%* | 7 | 5 | 2 |
| | 5.0% | 7 | 2 | 0 |
| | 4.0% | 9 | 2 | 7 |
| | 4.0%* | 21 | 0 | 19 |

* = muestra sometida a un segundo tratamiento de calor

3.2. Inoculación experimental

A pesar de todas las pruebas previas realizadas para optimizar la concentración del inóculo, el número de animales que sobrevivieron a los primeros diez días post-inoculación se redujo considerablemente en todos los casos. Por esta razón, el número de animales que finalmente fueron analizados para cada muestra resultó diferente dependiendo de las bajas aparecidas en cada

uno de los grupos. En total, el número final de ratones inoculados con las diferentes muestras que sobrevivieron y que, por lo tanto, fueron incluidas en el estudio, fue 148 animales (Tabla 5).

Tabla 5: Relación del número de animales inoculados inicialmente para cada muestra y los que finalmente sobrevivieron tras 10 días post-inoculación y que, por lo tanto, pudieron ser valorados e incluidos en el estudio.

| Muestra | Número de ratones inoculados | Animales supervivientes a los 10 días |
|---------|------------------------------|---------------------------------------|
| 439 | 54 | 36 |
| 440 | 45 | 33 |
| 441 | 41 | 26 |
| 442 | 38 | 25 |
| 447 | 51 | 28 |

El tiempo de incubación máximo de los animales (24 meses) se estableció debido a que, a partir de ese tiempo, los síntomas provocados por la enfermedad eran difíciles de distinguir con los asociados a la edad. Durante todo ese periodo, como ya se ha explicado en el capítulo de Material y Métodos, los animales fueron inspeccionados regularmente para tratar de detectar los síntomas relacionados con la enfermedad, como cambios en el comportamiento y cualquier otra manifestación de la enfermedad o la aparición de cualquier otro signo clínico que comprometiera la salud o bienestar del animal.

Un total de 44 animales sobrevivieron hasta los 24 meses post-inoculación. Eso significa que menos de la mitad de los ratones inoculados con cada una de las muestras vivieron durante todo ese periodo (439: 38%; 440: 21%; 441: 27%; 442: 28%; 447: 36%). El resto murieron de forma natural o fueron sacrificados antes del fin del experimento en base a los criterios de punto final establecidos en el ensayo experimental. Los animales que sufrieron tumores (15%), heridas

sangrantes por arañazos o mordiscos (14%) o prolapso de intestino (10%), fueron sacrificados prematuramente. Estos animales murieron a partir del mes 13 de incubación, con un marcado incremento de la incidencia a partir del mes 19. Aunque la muerte de todos ellos fue por causas ajenas a la enfermedad, algunos de ellos ya presentaban signos que podrían ser compatibles con ella (delgadez y apatía) en el momento del sacrificio.

Durante el periodo de incubación, una elevada proporción de animales presentaron síntomas que podían corresponderse con los signos clínicos específicos de la enfermedad, según se observa en la Tabla 6. Este número podría aumentar en el caso de la muestra 439 con dos animales que, según el informe, no presentaron signos clínicos durante el periodo de incubación, pero que murieron anticipadamente en el mes 14 y 16 en un estado de marcada apatía. Los signos más comúnmente encontrados fueron ataxia, falta de equilibrio, descoordinación motora y lordosis. Todos ellos aparecieron antes del mes 14 post-inoculación, a partir del cual los animales murieron paulatinamente, llegando con vida hasta el final del experimento (24 meses) y teniendo que ser sacrificados un 26%. En el único animal que ofreció un resultado positivo en las pruebas rápidas, el periodo de incubación fue de 17 meses. En algunos animales resultó difícil diferenciar algunos síntomas que podían deberse a la edad o, como en el caso del adelgazamiento, a otras enfermedades. De hecho, uno de los animales presentó extrema delgadez, pero al morir al 2º mes post-inoculación, se descartó la asociación con la enfermedad al representar un tiempo demasiado corto para el desarrollo de la EEB.

Tabla 6: Relación de animales que presentaron síntomas compatibles con una EET durante la incubación respecto al total de inoculados, así como el tiempo de aparición de los mismos.

| Muestra | Número de animales con síntomas | % animales con síntomas / animales inoculados | Rango (meses) de supervivencia de los animales |
|---------|---------------------------------|---|--|
| 439 | 8 | 22% | 21-24* |
| 440 | 6 | 18% | 18-21 |
| 441 | 5 | 19% | 18-24 |
| 442 | 11 | 44% | 19-24** |
| 447 | 6 | 21,5% | 18-24 |

*Un animal muerto a los 15 meses

**Un animal muerto a los 9 meses

3.3. Técnicas rápidas de diagnóstico en muestras murinas

En relación con los resultados obtenidos a partir de las pruebas rápidas aplicadas sobre las muestras de los animales incluidos en el bioensayo, la primera técnica aplicada en los hemiocéfalos de todos los animales muertos o sacrificados fue el *BSE EIA Test Kit de Roboscreen*.

Con esta técnica, sólo uno de los animales manifestó un valor positivo evidente, presentando un resultado que sobrepasaba los límites de detección. Este ratón se correspondía con el inóculo de la muestra 440, a una concentración del homogeneizado del 10%.

El resto de los animales proporcionaron un resultado inferior al *cut-off* calculado en la correspondiente técnica y que, en este caso, se estableció en 0,2. A pesar de que ninguno de ellos superaba ese límite, sí se comprobó que varios animales presentaban valores superiores a la media comparados con el resto de ratones inoculados (Tabla 7).

Tabla 7: Relación del número de animales que presentaron un valor ligeramente superior al resto de animales en el test de Roboscreen.

| Identificación de la muestra | Nº animales con un ligero aumento en el test de Roboscreen | Intervalo de valores obtenidos en el test de Roboscreen |
|-------------------------------------|---|--|
| 439 | 5 | 0.022-0.034 |
| 440 | 21 | 0.02-0.029 |
| 441 | 11 | 0.02-0.058 |
| 442 | 20 | 0.02-0.043 |
| 447 | 16 | 0.02-0.044 |

El valor positivo obtenido en esta técnica en el animal inoculado con la muestra 440 al 10% fue corroborado con la técnica *Bio-Rad PLATELIA BSE*, que confirmó el diagnóstico positivo de la misma.

Tras la aplicación de la técnica rápida de Roboscreen en todas las muestras, se trató de establecer alguna relación entre los resultados que se habían obtenido en este test con los animales que habían mostrado signos o manifestaciones clínicas durante el periodo de incubación. Dicha relación no fue posible de establecer ya que, a pesar de que algunos de esos animales presentaban ambos hechos, en la mayoría de los casos no coincidía la presencia de síntomas con un valor ligeramente superior en el test de Roboscreen. Aun así, los casos en los que no se encontraba esa relación solía corresponder con animales que habían muerto prematuramente o habían tenido que ser sacrificados basándose en los criterios de punto final, impidiendo valorar la evolución de la enfermedad hasta el final del tiempo del experimento.

En todos los animales, aunque prestando especial atención a los que no pudieron ser diagnosticados como positivos con las técnicas rápidas aplicadas pero desarrollaron síntomas durante el periodo de incubación, se aplicaron las

técnicas de confirmación detalladas a continuación para intentar llegar a un diagnóstico preciso y fiable de ellos.

3.4. Técnicas de confirmación en las muestras murinas

La primera técnica de confirmación aplicada a cada una de las secciones de los encéfalos extraídos de los ratones inoculados fue la inmunohistoquímica.

Con esta técnica, sólo un animal, el que había dado valor positivo en el test de Roboscreen, presentó positividad en el análisis inmunohistoquímico siguiendo el patrón de distribución esperado. En todas las secciones del encéfalo de ese animal se observó un depósito de PrPsc en forma de placa (Fig. 11). Aunque ésta era la forma predominante, el depósito granular de PrPsc también estaba presente en todas las secciones.

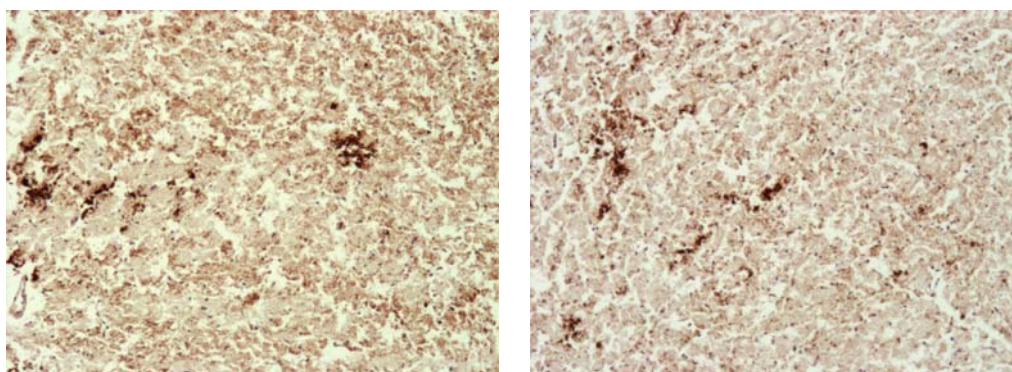


Fig. 11: Inmunomarcaje de PrPsc en el ratón inoculado experimentalmente con la muestra 440 que resultó positivo en el test de Roboscreen (100x).

A pesar de que el depósito de PrPsc en forma de placa fue visto solamente en ese animal, en otros muchos casos, se observó una señal compatible con positividad. Concretamente, en cada uno de los grupos de ratones pertenecientes a las 5 muestras bovinas inoculadas, hubo algún animal en el que se evidenció la presencia de este tipo de depósito de PrPsc. En todos ellos, la forma característica de depósito encontrada fue el patrón granular. Este resultado fue corroborado mediante la comparación del depósito con los 3 anticuerpos empleados, lo que confirmaba el diagnóstico y descartaba posibles inespecificidades al observarse

depósitos de PrPsc independientemente del anticuerpo utilizado (Fig. 12).

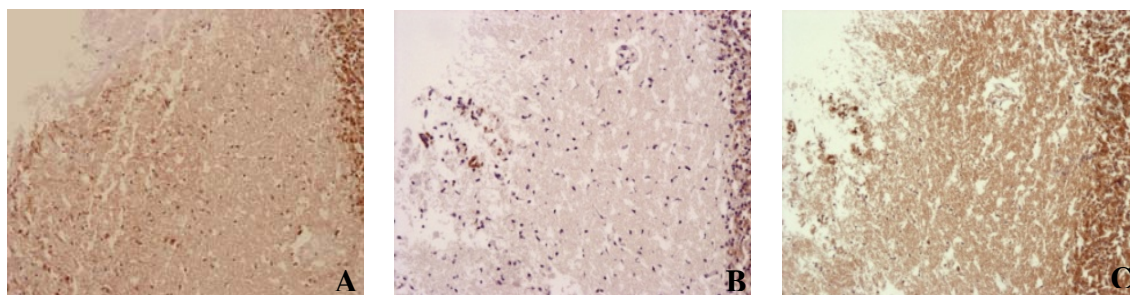


Fig. 12: Inmunomarcaje de PrPsc en una misma muestra procedente de un animal del bioensayo inoculado con la muestra 439 mediante la técnica inmunohistoquímica con 3 anticuerpos: 6H4 (A), R145 (B), F89 (C; 100x).

Esta repetibilidad de inmunomarcaje con los 3 anticuerpos fue vista concretamente en 18 de los ratones (nº/muestra: 4/439, 2/440, 3/441, 5/442, 4/447), confirmando el diagnóstico positivo de estos animales mediante la aplicación de esta técnica (Tabla 8). Además de estos 18 casos citados, hubo otros en los que la repetibilidad se evidenciaba con dos de los 3 anticuerpos probados. En estos casos es preciso señalar que resultó imposible obtener cortes seriados de las muestras, por lo que las zonas analizadas con el tercer anticuerpo no coincidían con las analizadas con los otros dos anticuerpos. Esto ocurría en 12 de los animales (Tabla 8).

En resumen, el número de ratones que fueron considerados positivos con la técnica inmunohistoquímica por encontrar coincidencia de depósito con, al menos, dos de los anticuerpos testados, se estableció en 30 animales distribuidos de la siguiente manera: 11 inoculados con la muestra 439, 3 con la 440, 5 con la 441, 6 con la 442 y 5 con la 447. A pesar de que se decidió considerar sólo estos animales como positivos, cabe señalar la existencia de 12 muestras en las que se evidenció depósito de PrPsc con un anticuerpo, no pudiendo descartar la posibilidad de que esas muestras fueran también positivas.

Tabla 8: Listado de animales que presentaron inmunomarcaje de PrPsc mediante el análisis inmunohistoquímico con 2 ó 3 anticuerpos y, por lo tanto, fueron considerados positivos.

| Nº muestra | Nº ratón | 6H4 | R145 | F89 |
|------------|----------|-----|------|-----|
| 439 | 2 | X | X | X |
| | 5 | X | X | X |
| | 7 | | X | X |
| | 8 | X | X | |
| | 12 | X | X | |
| | 17 | X | X | |
| | 18 | | X | X |
| | 22 | X | X | |
| | 28 | | X | X |
| | 30 | X | X | X |
| | 36 | X | X | X |
| 440 | 3 | X | X | X |
| | 10 | X | X | X |
| | 13 | | X | X |
| 441 | 2 | | X | X |
| | 19 | X | X | X |
| | 21 | X | X | X |
| | 22 | X | X | |
| | 23 | X | X | X |
| 442 | 6 | X | X | X |
| | 8 | X | X | X |
| | 13 | X | X | |
| | 15 | X | X | X |
| | 21 | X | X | X |
| | 23 | X | X | X |
| 447 | 1 | X | X | X |
| | 3 | X | X | X |
| | 16 | X | X | X |
| | 21 | X | X | |
| | 23 | X | X | X |

Ante la escasa inmunotinción observada en todos estos animales y con el fin de poder amplificar la señal, como se ha indicado en la sección de Material y Métodos, se llevó a cabo una variación del protocolo inmunohistoquímico orientada a ampliar la sensibilidad de la técnica con la adición del paso del *linker*. Esta incubación añadida, a pesar de ofrecer teóricamente una mayor sensibilidad, no aportó mayor información relativa a la presencia de PrPsc, siendo los resultados similares a los encontrados con la inmunohistoquímica convencional (Fig. 13).

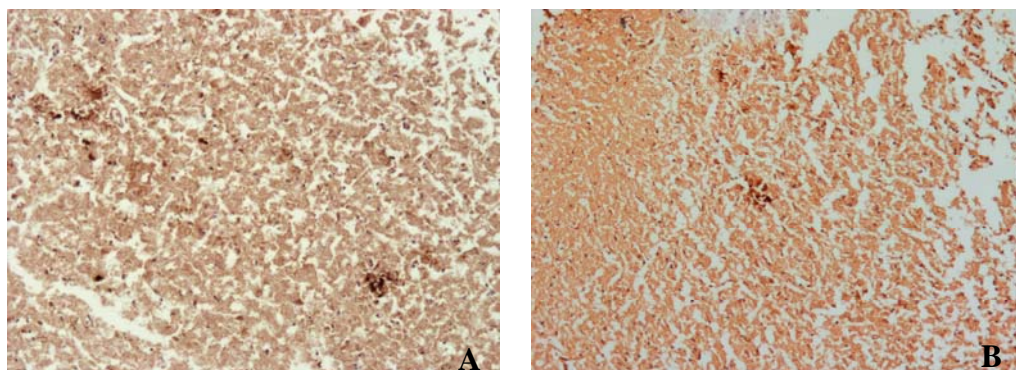


Fig. 13: Imagen comparativa de una muestra perteneciente al animal positivo en el test de Roboscreen mediante la aplicación del protocolo de la IHQ convencional (A; 100x) y con la adición del *linker* (B; 100x).

Con el mismo objetivo de aumentar la sensibilidad, se incorporó una modificación en relación con los protocolos anteriores consistente en la aplicación de la inmunohistoquímica ultrasensible. Con esta técnica tampoco se pudieron detectar más animales positivos de los ya descritos, pues no se logró un aumento de la señal de PrPsc en ninguno de ellos (Fig. 14).

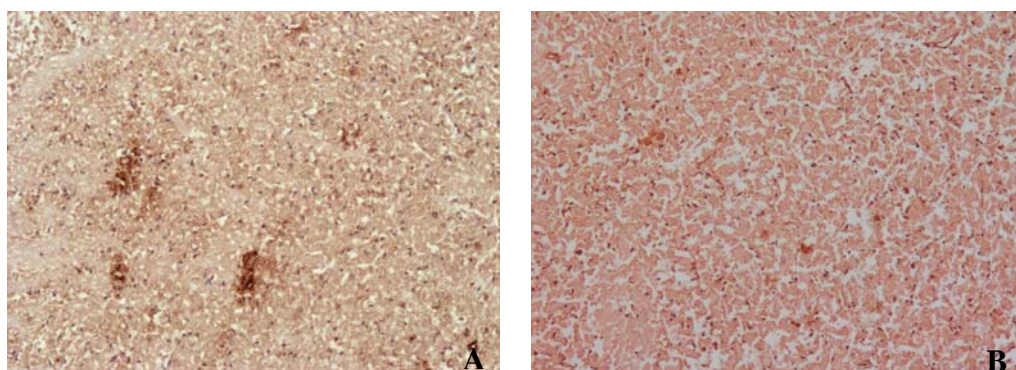


Fig. 14: Imagen comparativa de una muestra perteneciente al animal positivo en el test de Roboscreen mediante la aplicación de la IHQ convencional (A; 100x) y la IHQ ultrasensible (B; 100x).

Respecto a la distribución de la PrPsc en los animales que finalmente fueron considerados como positivos, no pareció que hubiera un área encefálica más afectada. En todas las secciones se llegó a encontrar depósito y, aunque parecía que la sección central correspondiente al área del tálamo podría estar menos afectada, la diferencia no fue muy acusada. Comparando todos los animales que habían presentado depósito de PrPsc, no se pudo establecer una correspondencia entre las secciones afectadas en cada uno de ellos, distribuyéndose los depósitos de manera heterogénea (Tabla 9).

Resultados

Tabla 9: Comparativa de los animales que presentaron inmunomarcaje de PrPsc en relación con las secciones analizadas en el análisis inmunohistoquímico con cada uno de los 3 anticuerpos.

| N° muestra inoculada | N° ratón | 6H4 | | | | | | R145 | | | | | | F89 | | | | | | |
|----------------------|----------|------------|---|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|------------|------------|------------|---|---|---|---|---|
| | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| 439 | 2 | x | | | | x | x | x | | | | | x | | | | | | | x |
| | 5 | | x | | | x | | x | x | | | x | x | x | x | | | | x | x |
| | 7 | | | | x | | | x | | | | | | x | x | | | | | x |
| | 8 | | | | | x | x | x | x | | | x | x | x | | x | | | x | x |
| | 12 | | | | | | x | | | | | | x | x | | | | | | x |
| | 17 | | | x | x | | x | x | x | x | x | | x | | | x | x | | | |
| | 18 | | | | | x | | x | | | | | | | x | | | | | |
| | 19 | | | | | x | | x | | | | x | x | | | | | | | |
| | 21 | | | | x | | | | | | | | | x | | | | x | | |
| | 22 | x | | | x | | | x | x | x | | | | | | | | | | |
| | 23 | x | | | | | | | | | | x | x | x | No muestra | | | | | |
| | 26 | | | | | | x | | x | | | | | x | | x | | | | |
| | 28 | | | | | x | | x | | | | x | x | | | | | | x | x |
| | 30 | | | | | x | | x | x | | | x | x | x | | | | | x | |
| 34 | | | | | x | | | | | | x | | | | x | | | x | | |
| 36 | | | | | x | | | x | | | x | | | x | x | | | x | | |
| 440 | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| | 2 | | | | | | x | x | x | x | | | x | | | | | | x | |
| | 3 | x | x | x | x | x | | x | x | x | x | x | | x | x | x | x | x | | |
| | 6 | | | | | | x | | x | x | | | x | | x | | | | x | |
| 10 | | | | | x | | | x | | | x | | x | x | | | x | | | |
| 13 | | | | | | | x | | | | | | x | | | | | | | |
| 441 | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| | 2 | | x | | | | x | x | x | x | x | | | | x | x | x | | | |
| | 18 | | | | x | | | x | | | x | | x | x | x | x | | | | |
| | 19 | | | x | | | x | x | x | x | x | | x | x | x | x | | | x | |
| | 21 | | | x | | | x | x | x | | | x | x | | x | | | | x | |
| 22 | x | | | | | x | | | | | x | x | | | | | | x | | |
| 23 | x | | | | x | | x | x | | | x | | | x | x | x | x | x | | |
| 442 | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| | 6 | x | | | | x | | x | | | | x | x | x | x | | | x | | |
| | 8 | | | x | | | | | | x | | | | | x | | | | x | |
| | 13 | | | | | x | x | x | | | | x | | x | x | | | | x | |
| | 14 | | | | | | | x | | | | | | x | | | | x | x | |
| | 15 | x | x | | | | x | x | x | | | x | | x | x | x | | x | x | |
| | 16 | | | | | x | | | | | | x | | | | | | x | | |
| | 20 | | | | x | | x | x | | | x | | x | x | | | x | | | |
| | 21 | | | | | x | | x | x | | | x | | x | | | | x | x | |
| 23 | | | | | x | x | x | x | | | x | x | x | x | | | x | x | | |
| 24 | x | x | | | | x | x | | | | | | No muestra | | | | | | | |
| 447 | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | N° sección | | | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| | 1 | | | | | x | | x | x | | | x | x | x | | | | x | x | |
| | 3 | x | | | | x | x | x | | | | x | x | x | | | | x | x | |
| | 16 | | | | | x | | | x | | | x | x | | | | | | x | |
| 21 | x | | | | | x | x | | | | x | x | x | | | | | x | | |
| 23 | | | | | | x | | | | | | x | x | | | | | x | | |

Respecto a los patrones de depósito observados, como ya se ha especificado, el patrón en placa sólo fue encontrado en uno de los ratones inoculados, coincidiendo con el único animal que había proporcionado un resultado positivo con la técnica rápida de Roboscreen (Fig. 15A). En cuanto al resto de animales que fueron finalmente considerados como positivos por inmunohistoquímica, el depósito presentaba una apariencia granular en todos los casos de forma heterogénea por toda la sección de la muestra que no llegaba a agregarse en placas en ninguna de las muestras analizadas (Fig. 15B). En algunos animales también se encontró un depósito difuso (Fig. 15C), similar al descrito en otros estudios como el de Capobianco *et al.* (2007; Fig. 15D).

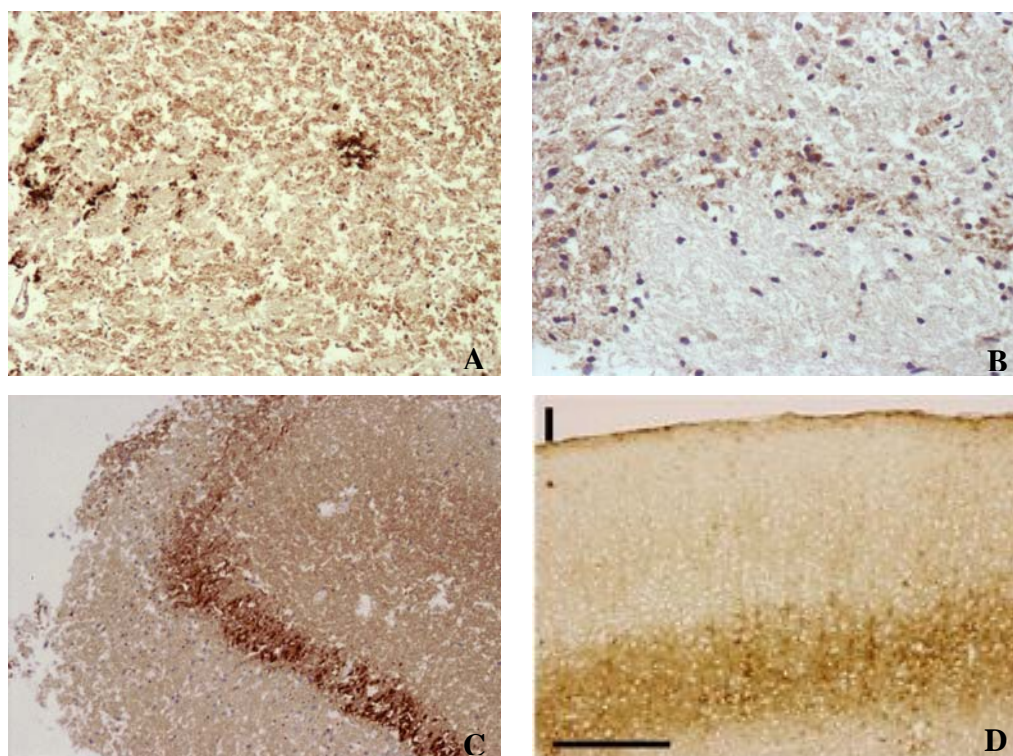


Fig. 15: Inmunomarcage de PrPsc en placa (A; 100x), en patrón granular (B; 200x) y en patrón difuso (C; 100x) evidenciado por IHQ respecto al patrón difuso observado en el estudio de Capobianco *et al.* (2007; D: 100x).

Respecto a la localización de la PrPsc, se observó que era heterogénea pero había que destacar una de ellas que, en muchos casos, parecía asociarse a una población celular específica, probablemente de naturaleza glial (Fig. 16).

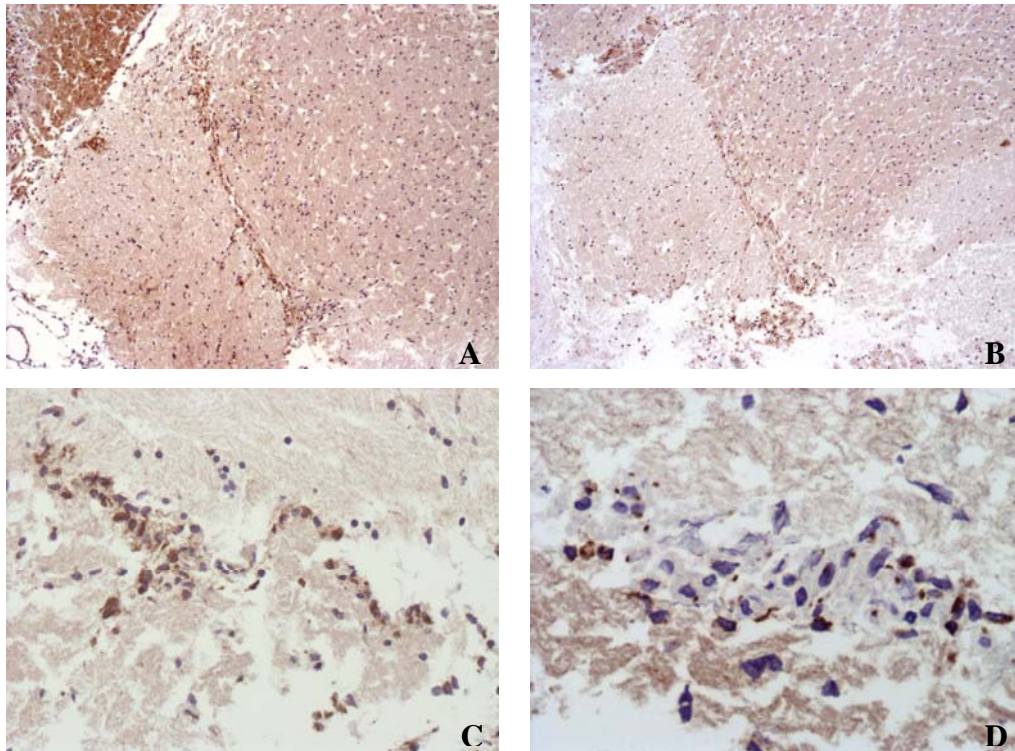


Fig. 16: Localización del inmunomarcaje de PrPsc evidenciado en muchos casos, que parece sugerir una relación con células gliales mediante la inmunohistoquímica convencional (A y B: 50x; C: 200x; D: 400x).

Este depósito de la PrPsc permanecía siempre constante con independencia del anticuerpo testado, coincidiendo tanto en el patrón de depósito como en su localización (Fig. 17).

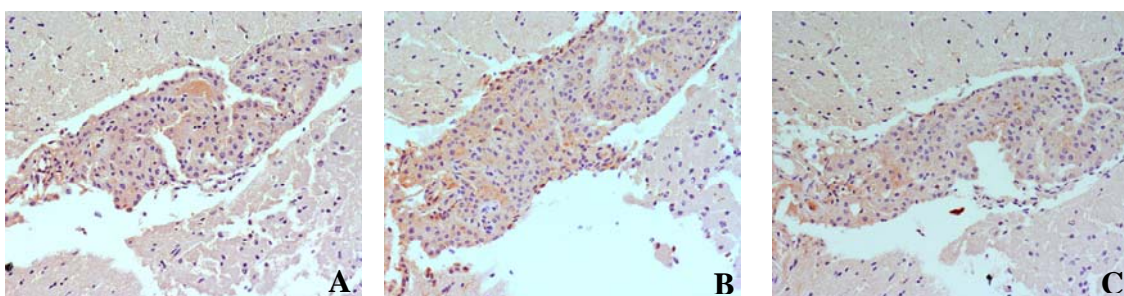


Fig. 17: Imagen comparativa del inmunomarcaje de PrPsc que parece sugerir una posible relación con las células de la glía, en un mismo animal inoculado con la muestra 441, mediante la técnica inmunohistoquímica con los 3 anticuerpos testados: 6H4 (A), R145 (B) y F89 (C; 200x).

Con el fin de identificar cuáles eran las células asociadas a estos depósitos que podrían estar implicadas en el transporte de la PrPsc hacia el tejido nervioso, se utilizó la técnica de microscopía confocal. El objetivo era confirmar, mediante

estudios de co-localización, que estas células se correspondían con células de la glía y que contenían depósitos de PrPsc mediante estudios de co-localización. Y en efecto, con esta técnica microscópica, la relación quedó demostrada, al observarse depósitos de PrPsc que co-localizaban con células gliales en las mismas zonas (Fig. 18).

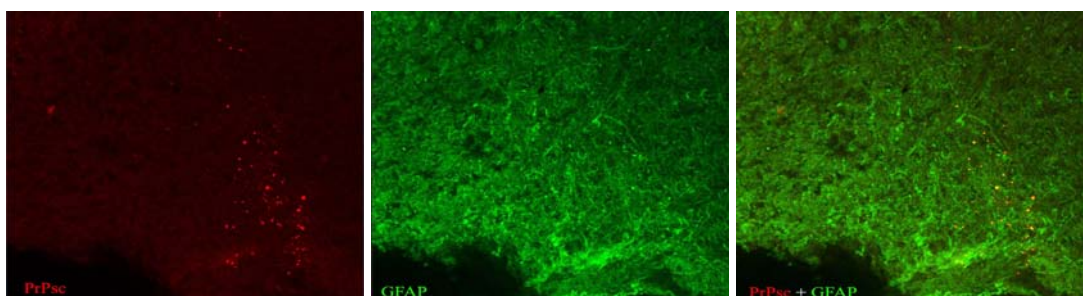


Fig. 18: Co-localización de los depósitos de PrPsc en relación con las células de la glía mediante la microscopía confocal. En rojo la proteína PrPsc, en verde las células de la glía y en amarillo la co-localización (100x).

Al igual que en las muestras autolíticas bovinas, en las secciones del encéfalo del ratón positivo a la técnica rápida y en algunos de los que habían sido clasificados como positivos mediante la inmunohistoquímica, se realizó la técnica de microscopía electrónica con el objetivo de visualizar las fibrillas SAF. Los resultados obtenidos con esta técnica confirmaron el diagnóstico positivo de los ratones inoculados al encontrar fibrillas en estas muestras, no sólo en el animal positivo con el test de Roboscreen, sino también en los animales que, a pesar de haber resultado negativos por la técnica rápida, habían sido clasificados como positivos finalmente por IHQ. Este hallazgo confirmaba el diagnóstico realizado con la inmunohistoquímica convencional y corroboraba la transmisión de la enfermedad a los ratones y la consiguiente positividad de las muestras inoculadas, así como el fallo de las técnicas rápidas para detectar positividad en ciertos casos. El tamaño de las fibrillas encontradas se correspondía con el de las descritas en las muestras bovinas, con una longitud algo menor que las anteriormente encontradas (Fig. 19).

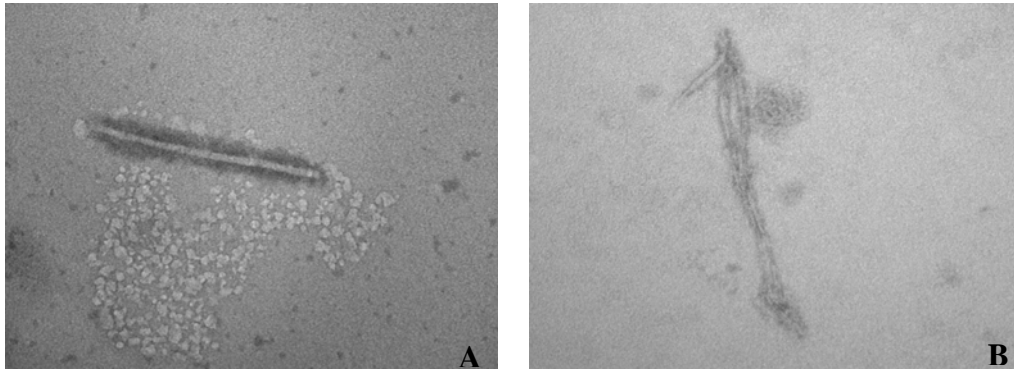


Fig. 19: Imagen de fibrillas SAF evidenciadas en muestras procedentes de ratones inoculados con las muestras bovinas del estudio mediante la técnica de detección de fibrillas SAF por microscopía electrónica (A: 100.000x; B: 150.000x).

Aunque estas fibrillas observadas en las imágenes coincidían en morfología y tamaño con lo descrito en estudios anteriores de microscopía electrónica, en el caso del ratón positivo, además de encontrar fibrillas aisladas como las ilustradas en la Fig. 19, aparecieron también grandes acúmulos de ellas, en relación con una mayor cantidad de PrPsc presente en la muestra (Fig. 20).

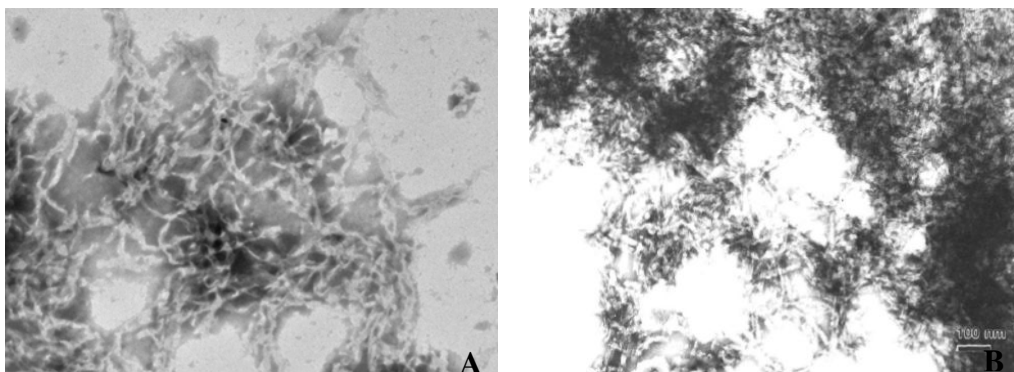


Fig. 20: Imagen de fibrillas SAF en el ratón positivo por el test de Roboscreen mediante la técnica de detección de fibrillas SAF por microscopía electrónica (A: 100.000x), semejantes a las visualizadas en el estudio de Liberski *et al.* (1991; B: 100.000x).

Al igual que lo realizado en las muestras bovinas, para confirmar que estas fibrillas se correspondían con presencia de PrPsc, se recurrió a la IHQ con oro coloidal. En esta técnica, las partículas de oro se unen a la PrPsc presente en las fibrillas (Fig. 21), lo que corroboraba que estas fibrillas estaban asociadas a la EEB y, por consiguiente, que el diagnóstico de estos animales era positivo.

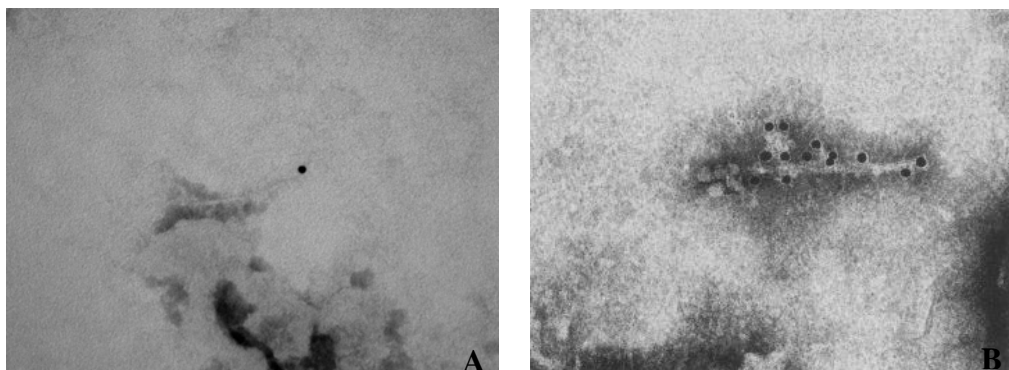


Fig. 21: Imagen de fibrilla SAF evidenciada en una muestra procedente de un ratón inoculado con una de las muestras bovinas del estudio mediante la técnica de microscopía electrónica con oro coloidal a 250.000x (A); en comparación con las visualizadas en el estudio de Merz *et al.* (1987; B: 143.000x).

Por último, resulta relevante mencionar que, tras realizar todas las técnicas de confirmación aplicadas sobre los encéfalos extraídos de los ratones inoculados inicialmente, se procedió a una segunda inoculación con tejido procedente del encéfalo del animal positivo. El modelo murino utilizado fue el mismo que en la inoculación inicial. Tras dos años de incubación, este segundo pase resultó positivo para la muestra procedente del animal diagnosticado como positivo en la inoculación inicial, confirmándose de nuevo la presencia de la enfermedad de la EEB en la muestra correspondiente.

Finalmente, recopilando todos los datos obtenidos a partir de la IHQ aplicada sobre las muestras del bioensayo, se trató de establecer una relación entre los animales que habían presentado síntomas durante el periodo de incubación y los resultados obtenidos con esta técnica de confirmación (Tabla 10).

Tabla 10.1: Relación de animales inoculados con la muestra 439 en función de la presencia de síntomas clínicos y los resultados obtenidos en la IHQ.

| Identificación de la muestra | Mes de la muerte del animal con síntomas | IHQ |
|------------------------------|--|-----|
| 439/2 | 23 | + |
| 439/5 | 18 (otras causas) | + |
| 439/7 | 21 (otras causas) | + |
| 439/8 | 24 | + |
| 439/12 | 15 (hallado muerto) | + |
| 439/16 | 22 | - |
| 439/17 | 22 | + |
| 439/18 | 24 (sacrificado) | + |
| 439/19 | 13 (otras causas) | + |
| 439/21 | 16 (apatía) | + |
| 439/22 | 21 (otras causas) | + |
| 439/23 | 24 (sacrificado) | + |
| 439/26 | 24 (sacrificado) | + |
| 439/28 | 24 (sacrificado) | + |
| 439/29 | 24 | - |
| 439/30 | 24 | + |
| 439/31 | 15 | - |
| 439/34 | 24 (sacrificado) | + |
| 439/36 | 24 | + |

Tabla 10.2: Relación de animales inoculados con la muestra 440 en función de la presencia de síntomas clínicos y los resultados obtenidos en la IHQ.

| Identificación de la muestra | Mes de la muerte del animal con síntomas | IHQ |
|------------------------------|--|-----|
| 440/2 | 18 (otras causas) | + |
| 440/3 | 17 | + |
| 440/5 | 19 | - |
| 440/6 | 19 | + |
| 440/10 | 18 (otras causas) | + |
| 440/13 | 22 (hallado muerto) | + |
| 440/16 | 13 | - |
| 440/26 | 21 | - |
| 440/31 | 17 | - |
| 440/33 | 19 | - |

Tabla 10.3: Relación de animales inoculados con la muestra 441 en función de la presencia de síntomas clínicos y los resultados obtenidos en la IHQ.

| Identificación de la muestra | Mes de la muerte del animal con síntomas | IHQ |
|------------------------------|--|-----|
| 441/1 | 2 | - |
| 441/2 | 15 (otras causas) | + |
| 441/6 | 19 | - |
| 441/10 | 15 | - |
| 441/17 | 24 | - |
| 441/18 | 24 (sacrificado) | + |
| 441/19 | 24 (sacrificado) | + |
| 441/21 | 24 (sacrificado) | + |
| 441/22 | 16 (hallado muerto) | + |
| 441/23 | 16 (otras causas) | + |
| 441/24 | 18 | - |

Tabla 10.4: Relación de animales inoculados con la muestra 442 en función de la presencia de síntomas clínicos y los resultados obtenidos en la IHQ.

| Identificación de la muestra | Mes de la muerte del animal con síntomas | IHQ |
|------------------------------|--|-----|
| 442/1 | 9 | - |
| 442/3 | 19 | - |
| 442/5 | 20 | - |
| 442/6 | 24 (hallado muerto) | + |
| 442/8 | 19 | + |
| 442/13 | 24 (sacrificado) | + |
| 442/14 | 16 (otras causas) | + |
| 442/15 | 19 | + |
| 442/16 | 20 | + |
| 442/18 | 19 | - |
| 442/20 | 22 | + |
| 442/21 | 23 | + |
| 442/22 | 24 | - |
| 442/23 | 24 (sacrificado) | + |
| 442/24 | 24 (sacrificado) | + |
| 442/25 | 24 | - |

Tabla 10.5: Relación de animales inoculados con la muestra 447 en función de la presencia de síntomas clínicos y los resultados obtenidos en la IHQ.

| Identificación de la muestra | Mes de la muerte del animal con síntomas | IHQ |
|------------------------------|--|-----|
| 447/1 | 23 (hallado muerto) | + |
| 447/3 | 15 (otras causas) | + |
| 447/9 | 24 | - |
| 447/10 | 13 | - |
| 447/16 | 11 (otras causas) | + |
| 447/18 | 17 | - |
| 447/20 | 24 | - |
| 447/21 | 24 (sacrificado) | + |
| 447/22 | 18 | - |
| 447/23 | 20 (hallado muerto) | + |
| 447/25 | 24 | - |

En todos los animales analizados, parece existir una relación directa entre la aparición de síntomas clínicos presentados y la presencia de PrPsc evidenciada por IHQ. La mayoría de animales (80%) en los que se habían detectado depósitos de PrPsc presentaron sintomatología clínica, pero los que no mostraron síntomas fueron los que habían muerto por diversas causas, por lo que se puede interpretar que esta muerte prematura podría haber impedido la evolución de la enfermedad hasta el final del tiempo del experimento.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Una de las claves para el control de cualquier enfermedad es un diagnóstico eficaz. La disponibilidad de técnicas con alta sensibilidad, que ofrezcan la garantía de un diagnóstico confirmatorio y fiable en todos los casos, es uno de los elementos claves en la investigación de cualquier patología. El problema que surge en las EET, es que, como se ha citado anteriormente, al ser el agente causal una proteína que no tiene material genético ni causa respuesta inmune, no se dispone de métodos serológicos, por lo que el diagnóstico de la enfermedad se basa exclusivamente en la demostración de la presencia de la proteína PrPsc en la muestra. Esta detección, con cualquiera de las técnicas diagnósticas descritas, confirma la positividad de la muestra aunque, a veces, lograr un diagnóstico definitivo puede ser complicado. Así, pueden aparecer resultados dudosos que necesitan la aplicación de otras técnicas para poder obtener un diagnóstico final.

En este estudio se analizan varios casos procedentes de bovinos que, en el momento de realizar el diagnóstico, presentaron un resultado no concluyente. El objetivo del estudio fue estandarizar y adaptar las técnicas oficiales de confirmación a las características específicas que presentan las muestras procedentes de esos casos para obtener un diagnóstico definitivo. Por otra parte, se pretendía realizar sobre este tipo de muestras un estudio comparativo de las técnicas de confirmación establecidas por la OIE para el diagnóstico de la EEB en lo que se refiere a la sensibilidad, fiabilidad y eficacia de cada una de ellas en este tipo de muestras, puesto que no se ha realizado hasta ahora según la bibliografía (Arnold *et al.*, 2007). Además de esta valoración comparativa, otro de los objetivos que se propusieron fue identificar la causa (o combinación de ellas) que explique el comportamiento particular que presentan las muestras con las técnicas aplicadas. La posibilidad de que una nueva cepa no descrita hasta el momento o que la naturaleza del agente causal presente en las muestras pueda estar interfiriendo en el resultado de las mismas en las técnicas diagnósticas, también debía de ser valorado.

En lo que se refiere a las técnicas rápidas, a pesar de presentar la ventaja de una mayor rapidez en el diagnóstico, en ocasiones su sensibilidad puede no ser suficientemente alta. Aun así, muchos autores siguen sosteniendo que proporcionan un bajo número de falsos negativos. En este estudio se demuestra que, en relación con las muestras estudiadas, la técnica rápida aplicada no es capaz de proporcionar un diagnóstico concluyente y son necesarias las técnicas de confirmación para lograr un diagnóstico definitivo. Lo mismo ocurre con las técnicas rápidas aplicadas a las muestras procedentes de los encéfalos de los ratones inoculados en el bioensayo, ya que sólo logran detectar la positividad de un animal respecto a los 30 animales que son diagnosticados con la inmunohistoquímica. Por ello, la reciente propuesta de la OIE dictaminando que dos resultados coincidentes obtenidos con dos técnicas rápidas son suficientes para realizar una confirmación oficial de la EEB en bovinos (http://vla.defra.gov.uk/science/docs/sci_tse_oie_bse.pdf), podría tener consecuencias inesperadas, ya que podría permitir que algunos animales afectados de EEB no fueran correctamente diagnosticados.

En este estudio, la aplicación de la técnica del *Western blot* de Prionics permite observar un perfil en todas las muestras que hace sospechar de la positividad de las mismas, pero sin poder considerar el resultado como concluyente. La causa más probable que puede justificar este diagnóstico sería la autólisis tan avanzada que presentan, aunque estudios anteriores habían demostrado que no afecta en el resultado de la técnica (Wear *et al.*, 2005). Por otro lado, a pesar de que en algunos estudios se habían podido detectar bajas cantidades de PrPsc en animales que no habían llegado a mostrar signos clínicos (Moynagh y Schimmel, 1999), la opción de la extremadamente baja concentración de PrPsc presente en las muestras bovinas objeto de este estudio, planteada desde el principio como la posible responsable del comportamiento de las muestras estudiadas, no puede descartarse. Aunque en algunos estudios se había adjudicado la obtención de resultados no concluyentes a la baja calidad de la muestra analizada (Carra *et al.*, 2009), parece que la falta de un resultado definitivo en esos casos se podría

asociar más a la inviabilidad para elegir el área de tejido a analizar (por el alto grado de autólisis que impide diferenciar las partes de la muestra) más que al estado autolítico en sí mismo. Este hecho está relacionado con lo que ya se había demostrado respecto a la diferente distribución y concentración de la PrPsc en el sistema nervioso bovino, lo que había señalado al obex como la zona de elección para el diagnóstico frente a otras áreas menos afectadas, que podían ser las causantes de esos falsos negativos obtenidos en muestras autolíticas (Schaller *et al.*, 1999). Si a la imposibilidad de elección de la zona del tejido a analizar se une la supuesta baja concentración de PrPsc en las muestras analizadas, se podrían entender los resultados no concluyentes obtenidos con las técnicas rápidas, como ya habían sido descritos en estudios anteriores (Bolea *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de no ofrecer un resultado definitivo, la aplicación de las técnicas rápidas resulta de gran utilidad como método de *screening* al revelar posibles muestras positivas que tienen que ser confirmadas posteriormente, por lo que desempeñan un papel decisivo para la detección de casos de EEB (Polak *et al.*, 2003).

Una de las principales conclusiones que se extrae a partir de este estudio es la posibilidad de confirmación de la fiabilidad de la técnica inmunocitoquímica desarrollada en Monleón *et al.* (2003). El hecho de que, en todos los casos, los depósitos de PrPsc sean detectados con 4 diferentes anticuerpos ya utilizados en estudios anteriores, 6H4 (Salguero *et al.*, 2006), R145 (Arnold *et al.*, 2007; Manning *et al.*, 2008), F89 (Koo *et al.*, 2001) y L42 (Salguero *et al.*, 2006), junto con la ausencia de señal en todos los controles negativos, permite descartar la posibilidad de que la señal se deba a inespecificidades. Pero, la especial relevancia de la positividad mediante la técnica demostrada en este estudio, confirmada posteriormente con otras técnicas de confirmación (microscopía electrónica y bioensayo en ratón), se basa en que se demuestra la eficacia de la inmunocitoquímica para muestras autolíticas de modelos naturales de infección. Dicha técnica había sido estandarizada (Monleón *et al.*, 2003), pero no había sido corroborada con otras técnicas de confirmación. Al igual que lo que sucede en los tests rápidos, la heterogénea distribución de la PrPsc en el tejido, además de la

imposibilidad de elegir la zona de estudio, también puede provocar en algunos casos falsos negativos que deriven de un fallo en la toma de muestras, pero no de la técnica. Aun así, la alta sensibilidad de la inmunocitoquímica queda demostrada al obtener resultados positivos en todas las muestras analizadas, a pesar de la baja concentración de PrPsc de la que se parece partir y de la autólisis, que dificulta la toma del área correcta, pero pone en evidencia una vez más la gran resistencia que posee la PrPsc frente a la degradación (Taylor, 2000). Al demostrar esta alta sensibilidad, mayor incluso que la que presentan otras técnicas (Arnold *et al.*, 2007), se confirma la inmunocitoquímica como una herramienta muy útil en el diagnóstico de la enfermedad en situaciones extremas, como son el estado de autólisis tan avanzado que presentaban las muestras estudiadas en este trabajo. Al mismo tiempo, no sólo se demuestra que el resultado de la técnica no está afectado por la autólisis, sino que también es capaz de detectar concentraciones extremadamente bajas de PrPsc (Bolea *et al.*, 2005), como las que se supone en las muestras valoradas en este trabajo.

Respecto al *Western blot* de confirmación establecido por la OIE, otra de las técnicas aplicadas sobre las muestras de estudio, no logra confirmar el diagnóstico positivo de las mismas. Ninguno de los protocolos probados de concentración y purificación de la muestra realizados previamente al protocolo de *Western blot* han servido, pues sólo se consigue obtener una ligera señal de positividad, pero no lo suficientemente evidente como para confirmar la enfermedad y, aún menos, su patrón característico. Como en el caso de las técnicas rápidas, la señal no concluyente que se obtiene con estas técnicas puede deberse a varias causas. En principio, la autólisis no debería ser la causa responsable, pues en estudios anteriores, con autólisis inducidas, se habían encontrado señales asociadas claramente a positividad (Katz *et al.*, 1992; Chaplin *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004), incluso tras someter las muestras durante 10 días a 65°C (Race *et al.*, 1994). Si la autólisis no parece afectar a la detección de la PrPsc por la técnica, este resultado no definitivo parece señalar a la supuesta baja concentración de PrPsc de las muestras como única causa de su débil positividad

(Debeer *et al.*, 2002; Iwata *et al.*, 2006). Lo que parece evidente es que la falta de un patrón glicosilado más claro puede ser justificado por esta baja concentración proteica, ya que unas bandas no convencionales ya habían sido relacionadas con dicha problemática (Gray *et al.*, 2011). Si comparamos la sensibilidad encontrada en este trabajo con la técnica de *Western blot* utilizando las muestras analizadas en relación con el resto de técnicas de confirmación, se observa que ésta es claramente menor porque sólo proporciona indicios de positividad, pero no logra confirmar el diagnóstico. Este resultado no es el que habían descrito otros autores (Buschmann *et al.*, 2004; Iwata *et al.*, 2006) que justificaban el uso de la técnica de *Western blot* debido a su mayor sensibilidad. Incluso respecto a la histología, técnica de confirmación más utilizada en los comienzos del estudio de la enfermedad, se afirmaba que la técnica de *Western blot* tenía una mayor sensibilidad al detectar PrPsc en animales sospechosos clínicamente de EEB, sin que éstos presentaran cambio esponjiforme (Cooley *et al.*, 2001). Seguramente, esto se debía a la falta de relación de la presencia de PrPsc con los signos neuropatológicos y la infectividad en algunos casos. Lo que sí se había descrito eran resultados negativos con la técnica de *Western blot* en ratones inoculados con bajas dosis de PrPsc que sufrían una enfermedad subclínica crónica, sin llegar a enfermedad terminal, y que presentaban una alta infectividad y presencia de PrPsc (Thackray *et al.*, 2002).

Por lo tanto, aunque ha sido descrita una gran eficacia de la técnica de *Western blot*, incluso en estudios recientes (Gray *et al.*, 2011), en este trabajo se demuestra la necesidad, en este tipo de muestras, de aplicarla junto a otras técnicas diagnósticas.

Un resultado similar se obtiene mediante el *Western blot* de diferenciación, en el que no es posible evidenciar el patrón de glicosilación correspondiente al agente causal en dichas muestras por la señal tan leve obtenida.

Otra de las técnicas de confirmación probadas es la microscopía electrónica. Esta técnica fue una de las que más se utilizaron en un principio como técnica de diagnóstico cuando se empezó a estudiar la enfermedad, aunque actualmente no sea una de las de elección, probablemente, por la dificultad en el acceso al equipamiento necesario para realizar todo el proceso y a la falta de experiencia en las técnicas de microscopía electrónica. Una de las ventajas que ofrece esta técnica es la alta sensibilidad y, especialmente, alta especificidad, basada en que la presencia de fibrillas SAF evidencia, sin ningún tipo de duda, la positividad de la muestra, ya que no se encuentran nunca en animales sanos (Bode *et al.*, 1985).

En este estudio, la sensibilidad de esta técnica queda definitivamente confirmada pues se demuestra, claramente, la positividad de todas las muestras al detectarse fibrillas en cada una de ellas. Además, se elimina la subjetividad en la valoración del diagnóstico, que podía llegar a ponerse en duda en relación con los resultados de la inmunocitoquímica y la inmunohistoquímica aplicada en el bioensayo. De nuevo, se corrobora la importancia de esta técnica que, a pesar de estar cada vez más en desuso como técnica en el diagnóstico de las EET, ha demostrado ser una de las más sensibles y de las que más información aporta. En este trabajo se pone de manifiesto el papel tan decisivo que puede tener la técnica de microscopía electrónica en el diagnóstico de la EEB, no sólo por su alta sensibilidad y especificidad, sino por todas las posibilidades que puede ofrecer, permitiendo, al ampliar el desarrollo de esta técnica, observar a nivel ultraestructural características que sólo pueden ser apreciadas por el microscopio electrónico y pudiendo incluso llegar a aportar conocimientos sobre la caracterización del agente causal de la EEB (Jeffrey *et al.*, 2010).

A pesar de la alta sensibilidad de esta técnica corroborada en éste y otros trabajos, algunos autores discrepan al hallar una baja correspondencia de los resultados del diagnóstico obtenidos con esta técnica respecto al *Western blot* (Scott *et al.*, 1990). Al contrario que en este trabajo en el que la técnica de *Western blot* no permite obtener un diagnóstico confirmativo como el demostrado por la

microscopía electrónica, algunos estudios han obtenido un mayor porcentaje de resultados positivos por WB que por microscopía electrónica (Cooley *et al.*, 1998), lo que les hacía considerar a la primera como más sensible que la segunda. Esta menor sensibilidad de la técnica de microscopía electrónica observada en algunos casos, con la consiguiente falta de detección de muestras positivas, se había considerado que podía depender de la zona del encéfalo analizada (Scott *et al.*, 1990). Según esta hipótesis, el no poder escoger la zona a analizar en cada caso, al igual que en las otras técnicas descritas, puede disminuir la posibilidad de obtener un diagnóstico correcto, situación probable especialmente en muestras autolíticas. Por esta razón, se reafirma de nuevo la importancia de una toma de muestras adecuada (Wells *et al.*, 1994b). Aunque desde el principio se había descrito la buena relación que existía entre la técnica de la detección de SAF con la presencia del agente de la EEB en el hospedador natural (Hope *et al.*, 1988; Scott *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 1994b), también se había visto que, a veces, era difícil encontrar estas fibrillas o, si aparecían, era de una forma mucho menos frecuente que en animales de experimentación (Dawson *et al.*, 1987). A pesar de la dificultad añadida de la supuesta baja concentración de PrPsc en las muestras a analizar, en este caso, se demuestra que el protocolo previo de concentración y purificación de la muestra es adecuado para aumentar la posibilidad de hallar las fibrillas que confirman el diagnóstico.

Respecto a la forma de presentación de las fibrillas, ésta es similar a la descrita en otros trabajos publicados. Las fibrillas que aparecen suelen presentarse aisladas y en forma de filamentos, como ya había sido referido por Multhaup *et al.* (1985). Aunque el número de fibrillas parece ser menor que el encontrado en casos convencionales de EEB, este hecho se podría correlacionar con la baja concentración de PrPsc de partida. En cuanto al tamaño de estas fibrillas, la diversidad de protocolos utilizados en los diferentes laboratorios podría ser la causa de que éste varíe un poco según los diferentes estudios. En comparación con trabajos ya realizados, el tamaño de las fibrillas observadas en este trabajo es ligeramente menor, tanto en longitud como en diámetro (Kascsak

et al., 1986). En concreto, es inferior a lo descrito en el estudio de Narang y Perry (1990), en el que las fibrillas presentan una longitud aproximada de 1 μm y un diámetro de 50 nm en las no tratadas con SDS y de 16-20 nm en las tratadas con SDS. La mayor acción de las proteasas atribuible al propio proceso de autólisis, justificaría cierta diferencia en las dimensiones encontradas. Aunque no existe un acuerdo sobre las medidas exactas de estas fibrillas, lo que sí parece es que las medidas observadas en este estudio son constantes y coinciden con el rango proporcionado por Somerville (1985) en cuanto al diámetro de las fibrillas. Según el tamaño, y teniendo en cuenta las variaciones citadas entre los diferentes trabajos publicados, parece que estas fibrillas de las muestras analizadas se pueden corresponder con las de tipo 1, ya que las medidas están dentro del rango especificado por Merz *et al.*, 1981 y Stack *et al.*, 1995 para este tipo de fibrillas, con un diámetro de 12 a 16 nm y una longitud que varía de 100 a 500 nm hasta 1 μm . Aunque, en principio, se descarta la relación con las fibrillas tipo 2, por su diámetro mayor (27-34 nm), no puede serlo por completo ya que Merz *et al.* (1981) encontró fibrillas de este tipo con un diámetro más pequeño (9-12 nm), similar al observado en este caso.

A pesar de que se acepta que las fibrillas SAF están formadas por PrPsc (Jeffrey y Halliday, 1994), una de las formas de verificar que las fibrillas observadas en las muestras de este estudio son específicas de la enfermedad, es la inmunohistoquímica con oro coloidal (Liberski *et al.*, 1997). Esta técnica, basada en la utilización de anticuerpos específicos para la proteína prión, tanto frente al extremo amino-terminal como al carboxi-terminal (Jeffrey *et al.*, 1996), evidencia fibrillas amiloides y ha sido usada en el estudio de las EET animales y humanas (DeArmond *et al.*, 1985; Doerr-Schott *et al.*, 1990; Jeffrey *et al.*, 1994). Las fibrillas encontradas en las muestras del estudio se revelan como fibrillas SAF, al unirse a ellas las partículas de oro que reconocen los anticuerpos específicos frente a la PrPsc. Las partículas de oro asociadas a las fibrillas SAF encontradas en este trabajo son escasas en comparación con otros estudios (Merz *et al.*, 1987). De nuevo, se considera que es debido al efecto de las proteasas, que podría haber

alterado los epítomos que reconocen los anticuerpos. Respecto a la localización de las partículas de oro, es similar a la observada en estudios anteriores, concretamente a lo largo y alrededor de las fibrillas (Di Fede *et al.*, 2007), con preferencia en el final de las mismas (Merz *et al.*, 1987).

Gracias a esta técnica de IHQ con oro coloidal, ha sido posible también detectar con bastante frecuencia unos depósitos de oro pareados. Las imágenes son similares a las halladas por Dourmashkin *et al.* (2004), que relacionaba esta localización característica de las partículas de oro con un dímero de PrPsc cubierto por una capa de lipoproteína sin una membrana delimitante. Según lo descrito en ese estudio, esas partículas sólo habían sido encontradas en ratones positivos, y no en los controles, por lo que su presencia confirmaría el diagnóstico de la enfermedad. Ersdal *et al.* (2003) sugirió que se trataba de áreas de formación potencial de fibrillas. En el estudio presentado, la presencia de este tipo de partículas pareadas también es menor, de nuevo en consonancia con la menor cantidad de PrPsc encontrada en las muestras demostrada en todas las técnicas realizadas.

En relación con la técnica de bioensayo en ratón, se acepta que es la que posee mayor sensibilidad. La sola transmisión de la enfermedad al modelo murino es sinónimo de la positividad de la muestra, pudiéndose considerar el diagnóstico como definitivo. La transmisión de la enfermedad a los ratones inoculados en el presente estudio se ha llevado a cabo en todos los grupos correspondientes a cada uno de los inóculos, por lo que esta técnica corrobora el diagnóstico positivo de las muestras bovinas ya demostrado con la técnica de microscopía electrónica y la inmunocitoquímica. Aun así, a pesar de confirmarse el diagnóstico, al producirse la transmisión sólo en un reducido número de animales respecto al inicial de ratones inoculados, la sensibilidad de la misma, tan aceptada hasta este momento, se replantea para muestras de características similares a las usadas en este trabajo. Esta ineficiencia del bioensayo en ratón, aunque fuera en casos puntuales, ya se había descrito en otros estudios como el de Ozawa (2007), en

Japón, en el que algunas muestras positivas no lograban transmitir la enfermedad a los ratones, incluso en un periodo superior a dos años.

El fallo en la sensibilidad de esta técnica para las muestras incluidas en este estudio queda demostrada porque la transmisión se produce, pero no de una forma tan clara como sería de esperar en ratones especialmente sensibles a la EEB como son los Tgbov XV (Scott *et al.*, 1999), capaces de ser afectados incluso con bajas concentraciones de PrPsc (Buschmann y Groschup, 2005). A pesar de usar el modelo correcto, las sucesivas diluciones y tratamientos térmicos previos realizados en los inóculos para garantizar el éxito de la inoculación, parecen haber sido la causa de una disminución aún mayor de la concentración de la proteína que, de partida, se pensaba ya escasa. De nuevo, se confirma esta hipótesis sobre la bajísima concentración de PrPsc en las muestras como la causante del fallo de las técnicas probadas inicialmente. Además, el hecho de que el único animal claramente positivo se corresponda con el inóculo del animal 440, que casualmente tiene una concentración mayor que el resto de los inoculados, apoyaría esta hipótesis. Por lo tanto, esta baja concentración de PrPsc inicial en los inóculos procedentes de las muestras bovinas parece haber sido la responsable de la baja transmisión de la enfermedad en el bioensayo. Aun así, gracias al refinamiento y adaptación de los protocolos aplicados, ha sido posible detectar muchos animales en cada uno de los grupos con signos compatibles con la positividad, tales como síntomas durante la incubación y depósitos de PrPsc en el análisis inmunohistoquímico.

En principio, la baja concentración de PrPsc también podría ser la causa principal de la ampliación del periodo de incubación observado en relación con el tiempo descrito en otros estudios, tanto en el animal positivo como en el resto de animales que presentan síntomas compatibles con la enfermedad. En este trabajo, la media del periodo de incubación en los animales hasta la presentación de síntomas, coincide con el baremo establecido por Fraser *et al.* (1992), que hallaba en el 100% de los ratones inoculados con EEB un intervalo de 265 a 700 días. Aun

así, la mayoría de los estudios manejan datos bien diferentes y normalmente inferiores, desde alrededor de 148,4 días (Dell’Omo *et al.*, 2002) hasta 230 días (Castilla *et al.*, 2003) ó 287 (Tortosa *et al.*, 2008) en ratones transgénicos bovinizados. A pesar de esta coincidencia de datos de la mayoría de los estudios, otros señalan un retraso en la aparición de los síntomas, similar a lo observado en este trabajo, como el caso de Bautista *et al.* (2006), en el que sólo el 20% de los ratones bovinizados afectados con EEB presentaban síntomas específicos a los 302 días post-inoculación. Lo mismo ocurría con el momento de la muerte del animal que, utilizando los mismos tipos de ratones transgénicos bovinizados, estaba descrito desde los 250 días aproximadamente (Baron, 2002b; Scott *et al.*, 1999) hasta 303-313 días (Espinosa *et al.*, 2007). En el presente trabajo, este periodo está más próximo a los 368-719 días de incubación que presentaban los ratones C57BL/6 inoculados con encéfalo de bovino afectado con EEB en el estudio de Lasmézas *et al.* (1997), aunque, al tratarse de ratones menos sensibles que los transgénicos bovinizados usados en los demás estudios, los datos no sean comparables. La conclusión a la que se llega es que el periodo de incubación presentado por los ratones inoculados en este trabajo es bastante mayor que el descrito en otros estudios, incluido en el animal positivo, por lo que se plantea la posibilidad de que algunos de los animales sacrificados a los 24 meses no tuvieran el tiempo necesario para desarrollar síntomas. Este tiempo se estableció porque a partir de entonces comenzaban a observarse síntomas neurológicos asociados a la edad, pero, a pesar de que parecía ser el adecuado para el desarrollo de la enfermedad según lo visto en otros ratones inoculados con EEB, este tiempo pudo haber sido demasiado corto debido a la baja concentración, lo que podría haber hecho perder un número de animales que hubieran desarrollado la enfermedad o muerto a causa de ella en periodos posteriores. A pesar de que la concentración de PrPsc parece ser la causa más probable que explicaría esta alteración en el periodo de incubación, otra posibilidad que hay que valorar, como se ha planteado al principio del estudio, es que un nuevo agente causal pudiera haber sido el responsable de la enfermedad en los animales de los que procedían las muestras estudiadas. Esta idea se basaría en el

conocimiento de que el periodo de incubación de la enfermedad depende del genotipo PRNP del ratón (Moore *et al.*, 1998), pero también del agente causal (Bruce *et al.*, 1991). De todas formas, esta hipótesis se plantea de manera teórica, ya que al no poderse realizar experimentos para la caracterización del agente, no puede ser demostrada.

Por lo tanto, parece que la menor carga infectiva de las muestras bovinas estudiadas, agravada por la necesaria dilución de los inóculos, que ha provocado la baja y lenta transmisión de la enfermedad, ha originado también los problemas y la diversidad de resultados en las técnicas aplicadas posteriormente en los encéfalos murinos. Sería lógico pensar que partiendo de una escasa concentración de PrPsc es esperable que la transmisión de la enfermedad a los ratones también se haya caracterizado por una escasa presencia de PrPsc.

Teniendo en cuenta los resultados observados tras la aplicación de la técnica inmunohistoquímica a las secciones de los encéfalos murinos, permitiendo detectar depósitos de PrPsc con los 3 anticuerpos utilizados, un alto número de animales demuestra de nuevo la relevancia de esta técnica. La dificultad para detectar señal con ella podría atribuirse al tratamiento previo de los encéfalos con ácido fórmico, que podía disminuir la intensidad de la señal (Brown *et al.*, 2003). Sin embargo, este paso aumenta la accesibilidad a los epítomos y su eliminación no influye en gran medida en el resultado de la técnica (Hardt *et al.*, 2000). Dado que la técnica inmunohistoquímica aplicada está estandarizada desde hace mucho tiempo, sorprende que no todos los ratones bovinizados (o una gran mayoría) presenten depósito de PrPsc tras la inoculación, lo que era de esperar según estudios similares en los que se encontraba PrPsc en el 100% de los animales tras 300 días post-inoculación (Bautista *et al.*, 2006). Partiendo de la base de que los depósitos de PrPsc aparecen antes de los signos clínicos (Arnold *et al.*, 2007) y que los animales del presente estudio han tenido un tiempo de incubación casi el doble que el de los ratones del estudio de Bautista *et al.* (2006), se debe pensar de nuevo que la concentración de proteína PrPsc presente en el

inóculo era francamente baja, aunque no se pueda descartar su atribución a otras causas. Algunos autores, como Thackray *et al.* (2002), afirman que las bajas cantidades de PrPsc se asociarían a que la evolución de la enfermedad habría cursado muy rápidamente en comparación con la acumulación de PrPsc o a que la PrPsc había sido más sensible a la proteinasa K de lo que se pensaba, provocando que su presencia fuera menor tras la digestión (Lasmézas *et al.*, 1997; Pastrana *et al.*, 2006; Gambetti *et al.*, 2008). También hay que tener en cuenta que además de la falta de presencia de PrPsc en algunas muestras, el depósito no tiene el aspecto habitual en la mayoría de los animales inoculados. Hasta el momento, se acepta que la EEB en el hospedador natural no presenta placas (Iwata *et al.*, 2006), pero que, al inocular el agente de la enfermedad a ratones, sí que es ésta su forma característica de presentación (Scott *et al.*, 1999), incluso con las cepas atípicas (Baron *et al.*, 2006). En este trabajo, sólo en el animal considerado positivo desde el principio mediante las técnicas rápidas aparecen depósitos de PrPsc en forma de placa que son teñidos con anticuerpos frente a PrPsc (Bendheim *et al.*, 1984b; DeArmond *et al.*, 1985) y con un tamaño similar, de entre 10 a 30 micrómetros de diámetro, o incluso mayor, al descrito en trabajos como el de Tateishi *et al.* (1984). La presencia de estas placas confirma que la transmisión de la enfermedad se ha llevado a cabo y que, por consiguiente, la muestra bovina correspondiente a ese ratón es positiva, ya que las placas nunca se encuentran en ratones viejos no afectados (Bruce y Fraser, 1982) ni en ratones inoculados con otros materiales (Tateishi *et al.*, 1984). Aunque las placas se consideren el patrón habitual de depósito encontrado en los ratones inoculados con EEB, ya se había visto que no eran tan frecuentes como se pensaba (Green *et al.*, 2005) y que podían aparecer de forma tardía (Bruce, 1981), alternándose con la forma difusa/granular (Lloyd *et al.*, 2004). Este último hallazgo explicaría en este trabajo que sólo uno de los animales presente placas debido a la lenta evolución de la enfermedad, mientras que el resto presente marcaje difuso o granular. La falta de placas en inoculaciones de EEB y vECJ ya había sido observada en diferentes tipos de ratones (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997); otras veces se había constatado la necesidad de un tiempo de incubación muy largo hasta la aparición

de estas placas, con un periodo comprendido entre 403 y 835 días y, a veces, con presencia exclusivamente en la zona de inoculación (Bruce, 1981; Tateishi *et al.*, 1984). De todas formas, el depósito de PrPsc, aunque no sea en forma de placa, visto en el resto de animales pertenecientes a cada uno de los grupos de ratones correspondientes a cada uno de los inóculos, indica que todas las muestras bovinas testadas se pueden considerar positivas porque han transmitido la enfermedad y la infección ha sido inducida.

El patrón de depósito de PrPsc granular se había descrito en ratones inoculados con el agente de la EEB (Scott *et al.*, 1999) aunque, a diferencia de la lentitud en la transmisión aquí descrita, en esos estudios los depósitos aparecían bastante antes, a los 150 días (Tortosa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009), e incluso, en algunos casos, a los 75 días (Lasmézas *et al.*, 1996), llegando sólo a presentar placas los animales que llegaban a un estado terminal (290-320 días post-inoculación). Debido a la baja concentración inicial de PrPsc en las muestras bovinas a la que se atribuye el retraso en la transmisión y evolución de la enfermedad en los modelos murinos, la mayor presencia del depósito granular se puede considerar un indicador del comienzo de la enfermedad en algunos animales. La ralentización en el desarrollo de la enfermedad se ha observado también en el animal positivo que ha necesitado más tiempo, hasta la aparición de placas, que los 180 días vistos en inoculaciones similares (Bautista *et al.*, 2006). Por esta razón, esta progresión de la enfermedad, más tardía de lo habitual, puede haber determinado que no haya dado tiempo a que la PrPsc se agregue para formar las placas típicas en los casos antes mencionados e incluso que, en otros, los animales no hayan llegado hasta ese estado terminal al ser sacrificados antes de ese tiempo. Aunque la presencia de placas se ha asociado siempre al periodo de incubación de la enfermedad, algunos estudios niegan esta relación o incluso afirman que es inversa (Büeler *et al.*, 1994). El hecho de que la diferencia en el patrón del depósito difiera porque se corresponda con el de una nueva cepa diferente a la clásica, tampoco puede descartarse en este trabajo. La escasez de depósito de PrPsc en placa podría servir así como forma de identificación de la

nueva cepa (Jeffrey *et al.*, 2010). Al no haber sido posible dicha caracterización, sólo se puede concluir la asociación de este hallazgo con la baja concentración de PrPsc.

La utilización de anticuerpos monoclonales específicos para PrPsc, que ya habían sido probados con éxito en otros trabajos publicados (Hardt *et al.*, 2000), permiten asegurar que la escasa concentración de PrPsc no ha sido un problema para la detección de estos depósitos, como había sido expuesto en relación con el anticuerpo 6H4 por Liu *et al.* (2003). Los animales en los que sólo se han detectado depósitos de PrPsc con un sólo anticuerpo, a pesar de ser el mismo tipo de depósito visto en el resto de animales, no han sido considerados como positivos. La imposibilidad de llevar a cabo cortes sucesivos de una misma sección para asegurar la validez de las comparaciones que se realizan, parece constituir la causa más probable de esta falta de repetibilidad. Cabe señalar que, a pesar de que en la mayoría de los casos los depósitos han sido detectados por los 3 anticuerpos, cuando uno fallaba solía ser el F89, anticuerpo N-terminal, cuya capacidad de captación de la PrP intracelular es menor que la de los otros 2 anticuerpos que reconocen el extremo C-terminal (Jeffrey *et al.*, 2001). Estas disconformidades entre distintos anticuerpos ya habían sido vistas anteriormente (Arnold *et al.*, 2007). Por el contrario, otros trabajos no habían observado esa diferencia entre los anticuerpos (Benestad *et al.*, 2003; Onnasch *et al.*, 2004; Nentwig *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2008) o la asociaban a una diferente sensibilidad de los mismos (González *et al.*, 2003). En el caso de que estas muestras bovinas del estudio se correspondieran con una nueva cepa, ésta también podría haber influido en las diferencias vistas en la captación de estos depósitos por los distintos anticuerpos, haciendo que variara el truncamiento de la PrPsc específica del agente de la EEB (Jeffrey *et al.*, 2001) según diferentes células o grupos de células (Jeffrey *et al.*, 2001).

Por último, además del depósito de PrPsc en forma de placa en un animal y en forma granular en el resto, en algunos de los ratones también se ha observado

un depósito difuso que ya había sido descrito en estudios anteriores, junto con la forma focal (Capobianco *et al.*, 2007), y que puede a veces pasar desapercibido por confundirse con fondo inespecífico (Giaccone *et al.*, 2000). El depósito encontrado en este trabajo es muy similar al descrito por Kitamoto *et al.* (1992) en casos de ECJ.

Por otra parte, la observación descrita sobre la existencia de depósitos asociados a las células de la glía parece indicar que estas células pudieran estar participando en la entrada y transporte del prión, al coincidir con los animales que presentan un estado más inicial de la enfermedad. La relación de la PrPsc con esta población celular ya había sido propuesta al referirse a patrones en los que se observaba a esta proteína tanto asociada a neuronas como a células de la glía (Jeffrey *et al.*, 2009). La idea de que estas células estuvieran participando en la propagación del prión también se ha sugerido antes (Ye *et al.*, 1998; Andréoletti *et al.*, 2002), apoyada por los estudios que demostraban que su replicación ocurría predominantemente en esas células (Mallucci *et al.*, 2003). Además, la demostración de la participación de los astrocitos en la formación de las placas amiloides en la enfermedad del Alzheimer (Nagele *et al.*, 2004), hace suponer que en esta enfermedad podía estar ocurriendo algo similar. En este caso, la localización de la PrPsc en relación con las células gliales es corroborada por las imágenes obtenidas con la técnica de microscopía confocal, como ha sido recientemente demostrado por Sarasa *et al.* (enviado para su publicación).

Además, esta localización, junto con los depósitos de PrPsc perivasculares observados en varios de los animales y similares a los encontrados por Miller *et al.* (1993) y Ryder *et al.* (2001), apoyan también la posibilidad de la participación de la sangre en el transporte del prión, desde la cual las células gliales transportarían la PrPsc hacia el interior del SNC. Esta idea de la implicación de la barrera hemaotencefálica en la propagación del prión en el sistema nervioso ya había sido propuesta por Rodríguez *et al.* (2009). Además, la vía hematogena como vía de propagación de los priones, que había sido sugerida por Sisó *et al.*

(2009) con la participación de los órganos circunventriculares en este proceso, explicaría la localización de la proteína prión en la periferia del tejido vista en este estudio, implicando que los priones habían sido transportados por células hematopoyéticas desde el punto de entrada hasta el encéfalo (Manuelidis *et al.*, 2000; Aguzzi *et al.*, 2004). La propagación de los priones no ha sido totalmente clarificada, por lo que la confirmación de esta vía de transporte sería de gran importancia en el estudio de la enfermedad e implicaría el esclarecimiento de nuevos mecanismos patogénicos. Además, los riesgos derivados de las nuevas posibles vías de transmisión de la enfermedad (Houston *et al.*, 2000) tendrían que tenerse en cuenta, como el riesgo existente de transmisión mediante transfusiones humanas (Aguzzi *et al.*, 2004), comprobado ya en ovejas incluso antes de la aparición de los signos clínicos (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002).

Tras llevar a cabo la comparación de todos los datos obtenidos a partir de los animales positivos inmunohistoquímicamente respecto a los que presentaron síntomas compatibles con la enfermedad, se observa que, en algunos de los casos, no se puede establecer una relación entre ambos. Esta falta de relación entre la PrPsc y los síntomas en ratones afectados ya se había observado antes (Hill *et al.*, 2000) y, a continuación, se pretende analizar todas las razones que pueden causar ambas situaciones.

Tal y como ha sido descrito en el Capítulo de Resultados, en este trabajo se ha observado un grupo de animales que presentaron depósitos de PrPsc en el análisis inmunohistoquímico sin desarrollar síntomas durante el periodo de incubación, lo que se relaciona con la infectividad. Un hecho similar se había demostrado anteriormente, ya que ratones inoculados con EEB podían presentar depósitos de PrPsc en el encéfalo sin desarrollar signos neurológicos (Baron, 2002b), lo que podía deberse a que la presencia de estos depósitos y placas amiloides podía asociarse con ausencia de infectividad (Piccardo *et al.*, 2007). Si esta infectividad no alcanzaba un cierto nivel (Tsutsui y Kasuga, 2006), los signos clínicos no eran manifestados, como podía haber sucedido en los ratones del

presente estudio al no haber transcurrido el tiempo suficiente debido al retraso en la evolución de la enfermedad. El problema que se plantea es que, como ya se había insinuado en estudios anteriores (Lasmézas *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1999; Manson *et al.*, 1999; Shaked *et al.*, 1999; Race *et al.*, 2002), si el depósito de PrPsc y la infectividad no estaban tan relacionados en algunos modelos de enfermedad, habría que reconsiderar la detección de PrPsc como el principal criterio para definir la infectividad en animales y humanos en ausencia de estudios de transmisión (Piccardo *et al.*, 2007). Podría haber animales que presentaran evidencias patológicas y bioquímicas de la presencia de PrPsc mediante la aplicación de técnicas como la histología, inmunohistoquímica y *Western Blot* (Asante *et al.*, 2002), sin haber tenido ningún signo de presencia de enfermedad y muriendo a causa de la edad.

La primera posibilidad que se puede plantear para explicar esta situación ya citada anteriormente es asociar esta falta de síntomas a la baja concentración de PrPsc en las muestras bovinas iniciales. Debido a este retraso en la evolución de la enfermedad, el tiempo de incubación podría ser demasiado corto, no permitiendo la evolución de la enfermedad de forma natural hasta un estado clínico o terminal (Farquhar *et al.*, 1996). Como en este tipo de enfermedades los depósitos de PrPsc preceden a la patología (Lasmézas *et al.*, 1996) y son detectables varios meses antes que los signos clínicos y las lesiones (Wells *et al.*, 1998; Grassi, 2003; Gavier-Widén *et al.*, 2005), la situación de estos ratones podría quedar justificada. Incluso esta presencia de PrPsc en los animales no asociada al desarrollo de síntomas, podía evolucionar a un estado de portador persistente del animal propuesto por algunos autores (Collinge y Clarke, 2007). De este modo, la cantidad de PrPsc presente en el encéfalo podría no estar tan correlacionada con la sintomatología como se creía en un principio.

Por otro lado, la segunda posibilidad que explicaría el caso de aquellos animales que, sin desarrollar síntomas, presentan depósito de PrPsc, podría estar en consonancia con la idea de que las enfermedades priónicas, a veces, pueden

presentarse sin manifestaciones clínicas (Frigg *et al.*, 1999), asociadas en tal caso a la falta de células B y cursando la enfermedad como subclínica. Un estado latente de la enfermedad o infección subclínica ya había sido propuesto por Collins *et al.* (2004) y demostrado en diversos estudios realizados en ratones (Race *et al.*, 2001; Asante *et al.*, 2002; Thackray *et al.*, 2002) en los que se encontraban animales asintomáticos a pesar de tener altos títulos de infección, incluso similares a los de los enfermos terminales, en encéfalo y otros tejidos (Hill *et al.*, 2000). Se había planteado que la causa de este comportamiento podía relacionarse con una posible infección cruzada, como la descrita en Race *et al.* (2002) entre ratones y hámsters, o con una adaptación de la infección a nuevas especies. Al considerar ambas opciones en el presente trabajo en concreto, la posibilidad planteada en un principio sobre la existencia de una nueva cepa que fuera la causa del diferente comportamiento de las muestras, podría ser sustituida por la sospecha de la posible adaptación de alguna de las ya existentes. De cualquier forma, el problema que se plantea es que, si se demuestra que la infectividad subclínica está presente en gran medida en la naturaleza, podrían estar pasando desapercibidos algunos casos, con todo lo que acarrearía este hipotético hecho para la salud pública. Al no presentar síntomas, estos animales afectados podrían no estar siendo detectados en los mataderos si no se realiza en ellos ninguna técnica diagnóstica. Un estudio realizado en mataderos de Japón, en el que animales diagnosticados como positivos tras la aplicación de un test rápido para la EEB (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) y, posteriormente, una inmunohistoquímica y *Western blot*, no habían mostrado signos clínicos o síntomas relevantes de la enfermedad, fue publicado por Iwata *et al.* (2006).

Un segundo grupo de animales cuyos resultados requerían ser discutidos a partir del estudio de relación entre presencia de PrPsc y síntomas nerviosos, son los animales que desarrollaron síntomas durante la incubación, pero posteriormente no presentaron depósitos de PrPsc en el análisis inmunohistoquímico. Este hecho también había sido mencionado en animales inoculados con Scrapie o EEB que desarrollaban signos clínicos de enfermedad

con ausencia de patología (Konold *et al.*, 2008). Se ha demostrado que la enfermedad puede ser transmitida en ausencia de PrPsc detectable (Lasmézas *et al.*, 1997) sin perder infectividad e, incluso, con altos títulos (Barron *et al.*, 2007). Parece por ello que la infectividad y la neurodegeneración pueden tener mecanismos separados (Collins *et al.*, 2004), por lo que, además del desarrollo de la enfermedad sin depósitos de PrPsc, también pueden existir agregados de PrPsc sin una infectividad asociada (Riesner *et al.*, 1996).

Todo esto obligaría a reconsiderar el verdadero papel de la PrPsc en la transmisión de la enfermedad. Aunque se había comprobado que la PrPsc estaba involucrada en el proceso patogénico de las EET, se puede poner en duda que sea el componente transmisible del agente causal o, incluso, el agente causal (Jeffrey *et al.*, 2010). Por un lado, se explicaría el comportamiento de este grupo de animales que han presentado síntomas, pero no depósito de PrPsc, pudiendo presentar incluso alta infectividad (Barron *et al.*, 2007). Aunque se ha demostrado que la PrPc es necesaria para desarrollar la enfermedad, puesto que ratones sin esa proteína (*knock-out*) son resistentes a infecciones experimentales (Sailer *et al.*, 1994; Baron, 2002b; Weissmann y Flechsig, 2003), la PrPsc no necesariamente tiene que ser el agente transmisible. En relación con esta hipótesis se han formulado varias teorías. Una de las posibilidades era la existencia de una forma de PrPsc sensible a la proteinasa K (sPrPsc) que no era detectada al ser totalmente digerida, como se ha sugerido en relación a la enfermedad de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (Nazor *et al.*, 2005). Pero también podía ocurrir que el agente causal fuera sólo una parte de la PrPsc (Barron *et al.*, 2007). Finalmente, la falta de detección de los depósitos de PrPsc podría deberse a la diferente sensibilidad que parece presentar la PrPsc frente a las proteasas, que es cada vez mayor conforme se alarga el periodo de incubación (Safar *et al.*, 1998), siendo, en este caso, superior al observado en inoculaciones similares.

En estudios previos, se había visto que posteriores pases sucesivos en ratón permitían una adaptación mayor de la cepa utilizada y, por consiguiente, un

acortamiento y estabilidad del tiempo de incubación (Kimberlin y Walker, 1977), una presencia más manifiesta de los signos clínicos neurodegenerativos, una mayor detección de PrPsc (Piccardo *et al.*, 2007) y, en definitiva, una expresión más clara de la enfermedad en general. De esta forma, con pases seriados se conseguía detectar la infectividad de forma más evidente. Al igual que en otros estudios anteriores en los que un sólo pase a un ratón receptivo había posibilitado la demostración de pequeñas cantidades de agente y, por consiguiente, la enfermedad subclínica (Hill *et al.*, 2000; Race *et al.*, 2001; Race *et al.*, 2002), en el trabajo presentado, con este segundo pase a partir del animal positivo, se confirma este hecho. Los resultados de este estudio apoyan la existencia de un umbral de concentración de PrPsc en relación con su infectividad en la transmisión.

Al igual que con las muestras bovinas, la técnica de confirmación de microscopía electrónica es aplicada a estas muestras murinas con el objetivo de verificar los resultados obtenidos en el análisis inmunohistoquímico y descartar la posibilidad de que las señales fueran inespecíficas. De nuevo, la técnica de microscopía electrónica se confirma como una herramienta fiable y precisa que posibilita la obtención de un resultado definitivo, ya que, al revelar la presencia de fibrillas SAF en las muestras murinas, corrobora el diagnóstico positivo de los ratones y, por consiguiente, de las muestras bovinas utilizadas en el estudio. El uso de estas fibrillas para la demostración de la transmisión de la enfermedad en el modelo murino ya había sido descrito en estudios anteriores, aunque principalmente en relación con el Scrapie (Kascsak *et al.*, 1986; Merz *et al.*, 1987) y no tanto en ratones inoculados con la enfermedad de la EEB, en la que apenas existen estudios al respecto. En este trabajo, el diámetro de las fibrillas es sólo comparable al de las fibras tipo 1, en su parte estrecha, descritas por Merz *et al.* (1981) y similar al observado en las muestras de origen bovino analizadas anteriormente. Además, aunque en el animal que había presentado placas en el análisis inmunohistoquímico se observan asociaciones de fibrillas, en el resto generalmente las fibrillas se localizan de forma aislada. La alta concentración de

PrPsc presente en dicho animal, respecto al resto de ratones inoculados, explicaría esta acumulación de fibrillas, que es semejante a la de estudios anteriores realizados en Scrapie y ECJ (Bode *et al.*, 1985; Merz *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1987; Stack *et al.*, 1995).

El objetivo de este trabajo ha sido tratar de explicar los resultados no concluyentes obtenidos tras los análisis efectuados mediante las técnicas de confirmación acerca de la presencia de infectividad en las muestras bovinas estudiadas. Como ya ha sido señalado, la propia naturaleza de las muestras parece ser la responsable principal de todos los resultados obtenidos, ya que se sabía previamente que podía influir mucho más en el diagnóstico que las características concretas de cada técnica (Kübler *et al.*, 2003). La primera dificultad encontrada ha sido la autólisis tan marcada que presentaban todas las muestras bovinas utilizadas, que ha podido dificultar la selección de las áreas con mayor probabilidad de depósito de PrPsc y ser responsable de la disminución de concentración presente, junto a la acción de las proteasas.

No obstante, a pesar del avanzado estado de autólisis que presentaban todas las muestras del estudio, no parece ser ésta la causa principal que justifique los resultados no concluyentes obtenidos en algunas de las técnicas aplicadas en este trabajo. Como ya se había visto en estudios anteriores, la autólisis no está necesariamente asociada a la degradación de la PrPsc (Debeer *et al.*, 2001; Chaplin *et al.*, 2002; Wear *et al.*, 2005), que puede ser detectada en encéfalos congelados y fijados (Debeer *et al.*, 2002), incluso cuando no se reconoce ni el tejido ni la zona donde puede estar situada esa proteína (Lasmézas *et al.*, 1996). Por esta razón, aunque en este trabajo no se hayan obtenido resultados concluyentes en algunas de las técnicas, no puede atribuirse a la autólisis, ya que en estudios anteriores no se había visto interferencia ni en técnicas rápidas (Meloni *et al.*, 2010) ni de confirmación, tales como la inmunohistoquímica (Debeer *et al.*, 2001; Chaplin *et al.*, 2002; Monleón *et al.*, 2003), *Western blot* (Schaller *et al.*, 1999) y visualización de fibrillas SAF (Scott *et al.*, 1992). De hecho, a pesar de ella, en este trabajo, se logran

resultados definitivos con la técnica inmunocitoquímica y la de microscopía electrónica. A pesar de que se había propuesto que con la inmunohistoquímica se podía perder sensibilidad (Novakofski *et al.*, 2005) y que, además, la acción de la proteinasa K podía dar origen a resultados inesperados (Lezmi *et al.*, 2004), en este trabajo, la inmunocitoquímica en frotis ofrece resultados concluyentes en todas las muestras. Ésta es una de las razones que permiten considerar a la inmunocitoquímica en frotis como una herramienta muy sensible y útil para el diagnóstico de la EEB en muestras autolíticas, al corroborar en modelos *in vivo* los resultados que hasta ahora sólo se habían probado en el laboratorio (Monleón *et al.*, 2003). Respecto a la microscopía electrónica, para obtener un resultado definitivo no influye el estado autolítico de las muestras, como ya se había descrito anteriormente (Scott *et al.*, 1992; Race *et al.*, 1994; Chaplin *et al.*, 2002). Por ello, los resultados no concluyentes no parecen ser provocados por la autólisis, sino por otra de las razones que se exponen con posterioridad. Aun así, la defectuosa toma de muestras, al no poder diferenciar la zona de tejido que debe analizarse debido al estado autolítico de las mismas, sí podría aumentar indirectamente la dificultad para la obtención de un diagnóstico definitivo. Un muestreo correcto es clave para un buen diagnóstico y para evitar falsos negativos, incluso por encima de la calidad del tejido (Meloni *et al.*, 2010). Además, la distribución heterogénea de la PrPsc en el tejido, junto con posibles bajas concentraciones del agente, como parece suceder en las muestras de estudio, aún habría dificultado más la correcta toma de muestras en estos casos, provocando unos resultados no concluyentes como los ya descritos en algunos trabajos (Schaller *et al.*, 1999; Cooley *et al.*, 2001; Chaplin *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2005; Arzac *et al.*, 2007). En estudios recientes, se indicaba que, en la EEB, zonas como cerebelo o regiones cerebrales caudales, que no eran recomendadas para el diagnóstico por la distribución no uniforme de la PrPsc (Polak y Zmudzinski, 2012), podían ofrecer falsos resultados. A pesar de todo, como se comprueba en este trabajo, la autólisis por sí misma no se considera un problema para la obtención de un diagnóstico y, en ningún caso, una razón suficiente como para que las muestras autolíticas sean eliminadas (Stack *et al.*, 2009) o ignoradas

(Hayashi *et al.*, 2004), lo que supone un sesgo en los análisis epidemiológicos de la enfermedad.

Sin embargo, la supuesta baja concentración inicial de PrPsc de las muestras bovinas sí parece ser el factor clave que puede explicar los resultados no concluyentes obtenidos en este trabajo. No resulta ser un impedimento para poder obtener un diagnóstico definitivo con la inmunocitoquímica y la microscopía electrónica, pero sí parece haber influido en la sensibilidad de otras, como las técnicas rápidas, el *Western blot* y el bioensayo en ratón, que no son capaces de detectarla o la detectan en proporción menor a la esperada. Aunque con las técnicas rápidas y el *Western blot* de confirmación los resultados no han sido concluyentes, la débil señal que detectan apoya el diagnóstico positivo de las muestras, ofreciendo un resultado compatible con una baja concentración de PrPsc en las muestras bovinas que puede estar cercana al límite de detección de estas técnicas. En el caso del bioensayo en ratón, la situación sería diferente, pues esta técnica confirma el diagnóstico de la enfermedad pero presentando un comportamiento diferente al esperado en cuanto a tiempo de incubación, presentación de síntomas y resultados en técnica de confirmación de los encéfalos murinos. Como ya se ha comentado, todos ellos pueden ser explicados también por la baja concentración inicial de las muestras bovinas y, por consiguiente, del inóculo aplicado a los ratones, en el que la concentración de PrPsc es aún menor por las diluciones sucesivas que han tenido que ser realizadas. Así, tanto el aumento en el tiempo de incubación como la presentación de la PrPsc en forma de depósitos granulares, y no en placa, además del menor número de ratones inoculados afectados en relación al esperado, parecen ser debidos a la baja concentración de PrPsc inicial y a la consiguiente disminución en el nivel de sensibilidad de cada una de las técnicas. Incluso, ésta puede ser la causa de la falta de correlación encontrada en algunos casos entre los animales que han desarrollado síntomas y los que han presentado depósito de PrPsc en la inmunohistoquímica. La diferente distribución de la PrPsc y el defecto en la toma de muestras derivado de la autólisis justifica aún más cómo afecta de manera

diferente cada inóculo en los ratones del estudio.

Aunque el bioensayo se considera una técnica de confirmación de gran sensibilidad, ya se había visto que era limitada, fijando el nivel de detección en 10^3 LD₅₀/g. Este límite podría ser uno de los motivos por los que, en este trabajo, algunos de los ratones inoculados pasaran desapercibidos, a pesar de ser positivos, al no llegar a la cantidad de PrPsc necesaria para ser captada por la técnica, detectando sólo los animales que recibieron una cantidad mayor a la referida anteriormente. Estos problemas en la captación debido a las bajas cantidades de PrPsc presentes en los ratones inoculados ya habían sido descritos en esta técnica. Estos animales podían no presentar signos neurológicos (Yokoyama *et al.*, 2007), pero también desarrollar síntomas preclínicos, durante muchos meses, que podían ser reversibles y no llevar al animal a un estado terminal a menos que apareciera la ataxia (Baron, 2002b; Thackray *et al.*, 2002).

Como se ha tratado de justificar a lo largo de este capítulo, la baja concentración de PrPsc en las muestras parece la causa más probable de los resultados no concluyentes descritos en este trabajo. Sin embargo, la hipótesis planteada desde el principio de la posible presencia de una nueva cepa no puede ser del todo descartada, a pesar de no haber obtenido resultados significativos que la avalen. El problema es que los dos principales métodos que pueden caracterizar la nueva cepa, el patrón de depósito de la PrPsc en la inmunohistoquímica (Vidal *et al.*, 2006) y el perfil de glicosilación en el *Western blot*, son imposibles de valorar. La inmunocitoquímica en frotis, debido al estado autolítico de las muestras, impide ese estudio, al igual que la falta de bandas diferenciadas en el *Western blot* que no permite analizar el patrón de glicosilación.

Aun así, los diferentes comportamientos encontrados en las diversas técnicas aplicadas podrían atribuirse a un nuevo agente causal no conocido hasta ahora. En este caso, podría estar sucediendo lo mismo que ocurrió en su momento con las cepas atípicas que se descubrieron por presentar débil señal en el ELISA y una

acumulación de inusuales pequeñas cantidades de PrPsc detectadas por WB (Yokoyama *et al.*, 2007), características que pueden compararse en cierto modo con lo encontrado en este trabajo. De esta forma, además, podría explicarse la variabilidad de los resultados encontrados en todas las técnicas, incluso en el bioensayo en ratón, en el que la menor sensibilidad evidenciada podría corresponderse con la menor sensibilidad de los ratones transgénicos bovinizados frente a una hipotética cepa atípica respecto a la de la cepa clásica. En tal caso, algunas de las características descritas, como mayores tiempos de incubación en el bioensayo en ratón o la diferente susceptibilidad genética en cada caso, podrían ser explicadas por la presencia de una nueva cepa en la que las nuevas características derivan de alteraciones del gen PRNP (Sander *et al.*, 2005). Si una nueva cepa fuera descrita, las hipótesis que podrían explicar esta aparición serían las mismas que las de las cepas atípicas: que el agente causal de la EEB en algún momento ha transformado su estructura dentro de las células afectadas, que varias cepas de Scrapie al infectar al ganado bovino han formado una nueva cepa atípica o que ha surgido alguna forma esporádica de EEB, como había ocurrido con la ECJ en humanos (Ozawa, 2007).

Lo que parece claro y queda evidenciado en este trabajo, es que en el curso de la aplicación del plan de vigilancia puede haber animales que no son diagnosticados en un principio y hasta pueden pasar desapercibidos, a pesar de ser capaces de transmitir la enfermedad. En este trabajo, se demuestra que la técnica de microscopía electrónica, a pesar de estar un poco en desuso, posee mayor sensibilidad para la detección de la positividad de muestras con resultado no concluyente por otras técnicas, incluso mayor que el bioensayo en ratón, que era hasta ahora una técnica considerada como determinante. Junto a ella, la inmunocitoquímica en muestras autolíticas se considera como una técnica eficaz para el diagnóstico de este tipo de muestras, ya que ha permitido conseguir resultados concluyentes y definitivos. A pesar de la sensibilidad mostrada por ambas, la microscopía electrónica resulta esencial porque confirma la objetividad de la técnica inmunocitoquímica, con la demostración de la existencia de fibrillas

específicas de la enfermedad. Por su parte, el bioensayo en ratón ha puesto de manifiesto la existencia de diversos problemas que han surgido en relación con la naturaleza y el estado de las muestras analizadas en este estudio, así como de la concentración de la PrPsc presente en dichas muestras.

Por otro lado, la comprobación en este trabajo de que, incluso con bajas concentraciones de PrPsc, la enfermedad puede ser transmitida, como ya se había visto por Wells *et al.* (2007), corrobora la importancia de disponer de métodos de diagnóstico eficaces de la enfermedad. Y es que un cierto control sobre la enfermedad es necesario desde el momento en el que se demuestra que la contaminación de los piensos, a pesar de haberse reducido considerablemente, nunca ha llegado a desaparecer (EFSA, 2005). Estudios previos han demostrado que muchos casos de EEB siguen sin diagnosticarse clínicamente y pueden terminar como ganado muerto o animales sacrificados de urgencia (Doherr *et al.*, 2001; Morignat *et al.*, 2002). Aunque esta enfermedad siempre ha tenido una baja prevalencia, que puede llegar a aproximarse a cero cuando están establecidas las medidas de prevención y erradicación (Anderson *et al.*, 1996), es importante conocer la situación real de la misma porque puede haber un estado de prevalencia esporádica (Stack *et al.*, 2009) que puede suponer un bajo, pero posible, riesgo para la salud pública. Además, puesto que el aumento del número de casos de EEB a partir de 1985 se correspondió, según varios estudios, con una baja exposición a la enfermedad (aunque larga en el tiempo) que llegó a afectar a un altísimo número de animales, el control sobre la misma debería de mantenerse (Kimberlin, 1993).

No obstante, es preciso tener en cuenta que, debido al largo periodo de incubación, los animales son sacrificados en su mayoría antes de alcanzar los niveles suficientes de infectividad que afectan al hombre y que, gracias a la eliminación de los materiales especificados de riesgo, hay muy pocas posibilidades de infección al hombre a través de la cadena alimentaria (Tsutsui y Kasuga, 2006). Aun así, aspectos tales como la especial habilidad de la EEB para

cruzar las barreras de especie y las diferentes manifestaciones que puede adoptar (nuevas cepas que puedan aparecer), hacen que resulte prudente mantener un cierto nivel de análisis basado en un correcto diagnóstico de la enfermedad. El riesgo de que el agente de la EEB pueda llegar a alterarse en esa transmisión (Asante *et al.*, 2002; Baron, 2002a), siendo difícil su reconocimiento, o que pueda confundirse en la oveja con el Scrapie (Foster *et al.*, 2001), exige la necesidad de que no haya muestras que puedan pasar desapercibidas para evitar la posibilidad de contaminación a humanos (Collinge *et al.*, 1996; Will *et al.*, 1996; Lasmézas *et al.*, 1997). Hay que tener en cuenta que los casos de EEB que puedan no ser diagnosticados podrían estar causando un índice mayor de vECJ subclínica y preclínica de lo previsto en los diferentes genotipos de PrP humana (Hilton *et al.*, 2004; Peden *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2006; Barron *et al.*, 2007) e incluso podrían ser la causa de algunos casos de ECJ esporádica (Asante *et al.*, 2002). Por todas esas razones, toda aportación realizada en la búsqueda de un diagnóstico exacto y fiable de la EEB resulta necesaria para conseguir un control sobre la enfermedad y evitar cualquier riesgo posible sobre futuras contaminaciones y transmisiones a otros animales y, especialmente, a la especie humana.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Mediante la aplicación de las distintas técnicas estandarizadas en este trabajo sobre las muestras objeto de estudio, se logra un diagnóstico definitivo que es, en todos los casos, positivo para la enfermedad de la EEB.
- Entre las técnicas de confirmación de la EEB valoradas en el presente estudio, la inmunocitoquímica y la microscopía electrónica se demuestran, para el diagnóstico de este tipo de muestras, como las técnicas con mayor sensibilidad, incluso superiores al bioensayo en ratón. La microscopía electrónica se confirma como una técnica capaz de realizar un diagnóstico objetivo y fiable en todos los casos.
- Se confirma, mediante el desarrollo de un modelo *in vivo*, la fiabilidad de la técnica de inmunocitoquímica desarrollada previamente para el diagnóstico de la EEB en muestras que presentan un avanzado estado de autólisis, al corroborar la transmisión de la enfermedad en modelo murino.
- La aplicación de las técnicas de diagnóstico probadas ha permitido comprobar que la autólisis no impide la obtención de un diagnóstico concluyente de la enfermedad, aunque éste se ve realmente dificultado cuando la concentración de PrP^{sc} presente en ellas no alcanza un valor suficiente.
- Los resultados de este estudio evidencian el fallo de los tests rápidos aplicados para obtener un resultado definitivo, lo que cuestiona lo establecido por la normativa actualmente en vigor, que no requiere la utilización de técnicas de confirmación para determinar la positividad o negatividad de una muestra.

- En el presente trabajo se ponen en evidencia diversas dificultades asociadas a la infección experimental de la EEB en modelo murino que no son con frecuencia mencionadas en la bibliografía relacionada.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

- By applying the different standardized techniques in the present study on the samples analyzed, a conclusive and positive BSE diagnosis is determined in all cases.
- Among all BSE confirmatory techniques which are assessed in the present study, immunocytochemistry and electron microscopy are confirmed as the most sensitive techniques for the diagnosis of these samples, even higher than the mouse bioassay. Electron microscopy is confirmed as a technique capable to provide an objective and reliable diagnosis in all cases.
- The reliability of immunocytochemistry for BSE diagnosis in samples with a very advanced state of autolysis (even in liquid state), is confirmed by an *in vivo* model, corroborating the results provided *in vitro* by the transmission of the disease to mice.
- The application of all diagnostic techniques tested here shows that autolysis does not prevent from establishing BSE diagnosis, although it can be actually hampered when PrPsc concentration is not enough in the samples.
- The results of this study show the failure of rapid tests on the samples analyzed to provide a conclusive diagnosis, which should make to question whether the current rules, which not require the use of confirmatory techniques to determine the positive or negative diagnosis of a sample, are really appropriate.
- Difficulties about the experimental assay in mice, which are not usually mentioned in the reviewed bibliography, are described in this work.

RESUMEN

RESUMEN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que, tras un largo periodo de incubación, provocan la muerte. El origen de la enfermedad reside en el cambio conformacional de una proteína localizada fisiológicamente en el tejido nervioso (proteína prión celular, PrPc) que adquiere características patológicas (PrPsc), siendo el único agente causal conocido y denominado prión. La identificación de los depósitos de PrPsc en el tejido nervioso central se considera específica de la enfermedad y en ello se basan la mayoría de las técnicas diagnósticas. Aunque estas enfermedades afectan a varias especies animales, además de a la humana, las más importantes son la enfermedad bovina (Encefalopatía espongiforme bovina), ovina y caprina (Scrapie), la del visón (Encefalopatía transmisible del visón) y la que afecta a cérvidos (enfermedad crónica caquetizante). El presente trabajo se ha centrado en la primera de ellas, la Encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

Tras la aparición de la EEB y el incremento progresivo en el número de casos de la enfermedad bovina desde 1987 y, particularmente, tras la demostración de la transmisión de ésta a humanos (variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, vECJ), se consideró absolutamente necesario disponer de métodos de diagnóstico sensibles y específicos. Por otra parte, el elevado número de animales a analizar obligó a disponer de técnicas de diagnóstico rápido, aunque ello supusiera una cierta pérdida en su sensibilidad.

En el curso del programa de vigilancia de la EEB establecido para la identificación de los casos de la enfermedad y la aplicación de las correspondientes medidas de control de la misma, uno de los problemas que surgió fue la existencia de muestras que ofrecían resultados no concluyentes.

En este trabajo se han estudiado varias muestras que no presentaron un

resultado concluyente con las técnicas de confirmación aplicadas de rutina, inmunohistoquímica (IHQ) y *Western blot* (WB), y que además presentaban un estado muy avanzado de autólisis. El objetivo planteado era analizar estas muestras mediante la aplicación de las técnicas de confirmación establecidas por la OIE, adaptándolas a las características que presentaban. Pero, además, se planteó realizar por primera vez una comparación exhaustiva sobre la capacidad de cada una de ellas para llevar a cabo el diagnóstico de este tipo de muestras.

Para el estudio, se han seleccionado 5 muestras de tejido encefálico bovino que presentaban un avanzado estado de autólisis y que habían sido diagnosticadas como muestras no concluyentes.

Con la técnica rápida utilizada (*Prionics-Check Western test*) estas muestras evidenciaron una señal, pero no lo suficientemente evidente como para ser consideradas como positivas, por lo que se aplicaron todas las técnicas de confirmación establecidas por la OIE, todas ellas con modificaciones debido al carácter autolítico que presentaban y, también, teniendo en consideración la hipótesis de que se pudiera partir de una cantidad muy baja de PrP^{sc}.

Las técnicas diagnósticas de confirmación fueron la inmunohistoquímica (IHQ), el *Western blot* (WB; *SAF Immunoblot*), la visualización de las fibrillas asociadas a Scrapie (SAF) mediante microscopía electrónica y el bioensayo en ratón. No fue posible utilizar la histología en estas muestras a causa de su autólisis. Por otra parte, se llevó a cabo también una técnica de diferenciación (WB) para intentar determinar el agente causal involucrado en estas muestras y evaluar la posibilidad de que una nueva cepa, diferente a la convencional, pudiera estar presente en ellas.

Respecto al resultado obtenido con las técnicas de confirmación aplicadas en este trabajo, se ha observado que la inmunohistoquímica y la microscopía electrónica han sido capaces de confirmar el resultado positivo de las muestras,

mientras que el *Western blot* sólo ha mostrado algunos signos de positividad, pero sin lograr confirmar el diagnóstico. El bioensayo en ratón ha mostrado eficacia, pero no total, al transmitir la enfermedad sólo en un número limitado de ratones.

La inmunohistoquímica ha permitido confirmar la positividad de las muestras al revelar depósitos de PrPsc en todas ellas, aunque fue preciso previamente realizar una adaptación del protocolo convencional debido al estado autolítico de las mismas. Dicha adaptación de la técnica para muestras con avanzado estado de autólisis había sido establecida con anterioridad en el Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, pero en este trabajo se ha corroborado por primera vez en modelo *in vivo* la eficacia de la técnica y su alta sensibilidad, lo que la convierte en una técnica adecuada y fiable para el diagnóstico de la EEB, a pesar del estado autolítico de las muestras analizadas.

Del mismo modo, la microscopía electrónica se ha revelado como una técnica muy sensible y objetiva para diagnosticar esta clase de muestras, ya que ha permitido confirmar los resultados observados en la inmunocitoquímica mediante la visualización de SAF, estructuras formadas por PrPsc que sólo aparecen en animales afectados por la enfermedad. A pesar de que la sola observación de las fibrillas es suficiente para realizar un diagnóstico definitivo, este hallazgo ha sido corroborado con la aplicación de la inmunohistoquímica con oro coloidal, al unirse las partículas de oro a la PrPsc localizada en las fibrillas.

La aplicación del *Western blot* de la OIE no ha ofrecido un resultado concluyente porque, a pesar de realizar previamente todos los protocolos de concentración y purificación, sólo se ha obtenido una señal muy débil. Con el WB de diferenciación se ha podido observar una señal sugestiva de positividad, pero también débil, por lo que no ha sido suficiente para determinar el patrón de glicosilación correspondiente al agente causal presente en las muestras

analizadas.

Respecto al bioensayo, en este trabajo se evidencia que esta técnica puede presentar en algunas ocasiones problemas para obtener un diagnóstico concluyente en este tipo de muestras. Aunque se ha confirmado la positividad de las muestras bovinas, ya que en cada uno de los grupos inoculados con las diferentes muestras se han detectado ratones positivos, el número de éstos ha sido muy reducido. Por otra parte, el depósito de PrPsc en placa, característico de la inoculación de EEB en la especie murina, sólo se ha observado en un ratón, a diferencia del resto de animales que han presentado depósitos de PrPsc con un patrón granular. Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica en este modelo *in vivo* se han corroborado al detectarse SAF mediante la técnica de la microscopía electrónica.

El conjunto de los resultados obtenidos en este estudio, mediante la aplicación de todas las técnicas utilizadas, puede ser explicado por la naturaleza y características de las muestras estudiadas. Así, parece que la autólisis no afecta en gran medida al diagnóstico de las muestras, ya que no logra impedir la obtención de un resultado concluyente en ellas.

Por otro lado, la posibilidad de la presencia de una cepa con nuevas características no ha podido ser descartada.

La explicación más probable para todos los resultados obtenidos con las técnicas aplicadas parece ser la baja concentración de PrPsc de partida presente en las muestras bovinas, que justificaría los resultados obtenidos en este estudio. Esta hipótesis se reforzaría si se tiene en cuenta la digestión enzimática que está asociada a los procesos de autólisis y que implicaría una disminución adicional de esa concentración de partida. Ello podría explicar el mayor tiempo de incubación de los animales inoculados respecto al observado en otros estudios similares, la presencia del depósito de PrPsc granular (no en placa) visto en la

mayoría de los animales inoculados, así como el menor número y tamaño de las SAF visualizadas por microscopía electrónica. Por otra parte, la falta de concordancia entre los animales con signos clínicos y su respuesta en técnicas de confirmación observada en algunos casos, podría ser explicada por la posibilidad de requerir periodos más largos de incubación asociados a la baja concentración de PrPsc, aunque también podría deberse a una relación no exclusiva entre la presencia de PrPsc y la infectividad, como ya ha sido sugerida por algunos autores.

SUMMARY

SUMMARY

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) are a group of neurodegenerative diseases which are characterized by a chronic course and lethal end. They are caused by a conformational change of a cellular protein mainly located in nervous tissue. After this structural change, the cellular prion protein (PrP_c) is converted into an isoform named pathological prion protein (PrP_{sc}) acquiring pathological features and constituting the only known causal agent, exclusively present in TSEs. Therefore, most of the diagnostic techniques are based on its detection. Although these diseases affect to a lot of animals species, including humans, the most affected species are cattle (Bovine Spongiform Encephalopathy), sheep and goat (Scrapie), mink (Transmissible Mink Encephalopathy) and deer (Chronic Wasting Disease). This work is focused on Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE).

The increase in the number of BSE cases since 1987 joint to the demonstration of the transmission of the disease to human species (variant of the disease of Creutzfeldt-Jakob, vCJD), involved a necessary improvement of BSE diagnosis by applying a suitable surveillance programme based on efficient confirmatory techniques. Besides, due to the high amount of cases to be analyzed since the beginning of the active surveillance programme, several rapid techniques appeared with the objective of accelerating the process, although the sensitivity could decrease.

As consequence, some problems also arose concerning BSE diagnosis due to some samples provided a non conclusive result by applying the routine confirmatory techniques.

Several samples whose results provided by the confirmatory techniques, immunohistochemistry (IHC) and Western blot (WB), were non conclusive, have been studied in the present work. Besides, these samples presented a very

advanced degree of autolysis. The objective of the study was to provide a diagnosis for these samples further to standardize the confirmatory techniques established by OIE in order to be used on similar samples. Moreover, a comparative study among all confirmatory techniques to provide a final diagnosis on this kind of samples is exhaustively presented here.

Five bovine samples from central nervous tissue presenting an advanced degree of autolysis were selected because they had been diagnosed as non conclusive cases by OIE techniques routinely applied.

Firstly, they showed some signal by rapid test (Prionics-Check Western test) but not enough to diagnose the samples as positive cases. All of the confirmatory techniques established by OIE were applied, all of them including some modifications due to the autolytic presentation also a possible initial very low concentration of PrPsc in the samples.

The confirmatory techniques tested have been immunohistochemistry, Western blot (Immunoblot), Scrapie associated fibrils (SAF) visualization by electron microscopy and bioassay in a murine model. Histological assessment was impossible to be applied on these samples because of their autolysis. Differentiation WB technique was developed to try to determine the causal agent involved in these samples, and to assess the possibility of that a new strain, not described to date, could be present in them.

Regarding the confirmatory techniques applied in this work, immunohistochemistry and electron microscopy have been both capable to confirm the positive result in all the samples. Western blot has only shown some signal suggesting positivity, but it has not been able to confirm the diagnosis. Bioassay has shown a partial efficiency to provide a final diagnosis for these samples since just a portion of the total number of mice has been finally infected.

Immunohistochemistry has been one of the techniques able to confirm the positivity in the samples, because PrPsc deposits have been observed in all of them. Based on the conventional protocol, this technique has been adapted to the autolytic state of the samples. The immunocytochemistry had been first established in Research Centre for Encephalopathies and Transmissible Emerging Diseases and, in the present study, its efficiency and high sensitivity has been first proved by an *in vivo* model, corroborating the immunohistochemistry as a suitable technique for BSE diagnosis despite the autolysis of the samples.

In the same way, a very sensitive and objective technique to diagnose this kind of samples has been proved to be the electron microscopy, corroborating the obtained results by immunocytochemistry by SAF visualization, which are PrPsc structures that only appear in affected animals. In spite of SAF visualization is enough to confirm a positive diagnosis, this finding has been corroborated by the application of the immunohistochemistry by using colloidal gold, evidencing gold particles jointed to PrPsc localized in SAF.

On the other hand, OIE Western blot application has not provided a conclusive result. Despite all the previous protocols of PrPsc concentration and purification, this technique has offered only a slight signal. Differentiation WB has shown a similar signal suggesting positivity, although not enough to determine the glycosilation profile corresponding to the causal agent present in tested samples.

Concerning the bioassay, in this work it has been shown that sometimes this technique can present some problems to provide a definite diagnosis on this kind of samples. Although the positivity of the bovine samples has been confirmed because there have been some positive mice in each group of inoculated animals with each sample, the number of affected mice has not reached 100% and some problems arose regarding this technique. Only one animal has presented a clear positive result by rapid techniques and presence of PrPsc deposit in plaque,

characteristic of the BSE inoculation in mice, with respect to the other animals which have presented granular deposits of PrPsc. However, the results by immunohistochemistry have been confirmed since SAF have been found by electron microscopy.

The results obtained in this study concerning all the applied techniques, could be explained by the source and features of the studied samples. In one hand, it seems that the autolysis has not largely affected to the diagnosis of the samples, because in all the techniques, as it has been shown, it does not constitute a reason to prevent a conclusive result.

By the other hand, the possibility of presence of a strain with new characteristics could not be demonstrated here.

The most probable reason to explain all results in the applied techniques seems to be the low content of PrPsc in the bovine samples, which would justify all the conclusions drawn in this study. This hypothesis would be supported by the enzymatic digestion which is associated with the autolytic process and could help to decrease the concentration. In the same way, this reason would explain the elongation of the incubation period in the inoculated animals in comparison with that observed in similar studies. The granular deposition of PrPsc, not plaque pattern, which is seen in the most of inoculated animals and the lower number and size of SAF visualized by electron microscopy, could be also explained. The disagreement between clinical signs and their results by confirmatory techniques in some inoculated animals would be explained by the longer periods of incubation associated with the low PrPsc concentration or, maybe, due to the lack of relationship exclusively between the presence of PrPsc and the infectivity, as it has been hypothesized by some authors.

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1: Ejemplo de imagen obtenida a partir de muestras positivas y negativas tras la aplicación del *Prionics®-Check WESTERN test* (European Commission, 1999). 42
- Fig. 2: Imagen detallada de los cortes realizados en cada uno de los animales del modelo murino, siguiendo el protocolo descrito en Barr *et al.* (2004).....55
- Fig. 3: Inmunomarcaje en frotis de la muestra bovina 439 (A), 440 (B), 441 (C), 442 (D) y 447 (E), así como de una muestra negativa procedente de un animal sano (F; 200x)..... 60
- Fig. 4: Imagen comparativa de inmunomarcaje en frotis bovinos de la muestra 442 con el anticuerpo L42 (A), R145 (B) y F89 (C; 200x)..... 60
- Fig. 5: Inmunomarcaje en un frotis bovino realizado a partir de la muestra 441 mediante una inmunohistoquímica convencional (A; 200x) y con la adición del *linker* (B; 200x)..... 61
- Fig. 6: Imagen obtenida mediante el *Western blot* de la OIE realizado en muestras autolíticas bovinas. 62
- Fig. 7: Patrón de glicosilación de una muestra de EEB, otra de Scrapie y una de las muestras estudiadas (447) mediante el *Western blot* de diferenciación con el anticuerpo CONTROL (A) y TEST (B)..... 63
- Fig. 8: Imagen de una fibrilla procedente de una de las muestras de tejido nervioso bovino objeto de este estudio procesada para su visualización con el microscopio electrónico (A; 60.000x). 63
- Fig. 9: Imagen de fibrillas procedentes de las muestras de tejido nervioso bovino objeto de este estudio procesadas para su visualización mediante la técnica de microscopía electrónica con oro coloidal a 120.000x (A); así como las visualizadas en el estudio de Merz *et al.* (1987; B: 143.000x). 64
- Fig. 10: Imagen comparativa de partículas de oro visualizadas en las muestras bovinas estudiadas (250.000x, diámetro de partículas de oro = 10 nm, 10A) y de las visualizadas en el estudio de Dourmashkin *et al.* (2004) con la misma técnica (416.000x, diámetro de partículas de oro = 5 nm, 10B)..... 64
- Fig. 11: Inmunomarcaje de PrPsc en el ratón inoculado experimentalmente con la muestra 440 que resultó positivo en el test de Roboscreen (100x)..... 73
- Fig. 12: Inmunomarcaje de PrPsc en una misma muestra procedente de un animal del bioensayo inoculado con la muestra 439 mediante la técnica inmunohistoquímica con 3 anticuerpos: 6H4 (A), R145 (B), F89 (C; 100x)..... 74

- Fig. 13: Imagen comparativa de una muestra perteneciente al animal positivo en el test de Roboscreen mediante la aplicación del protocolo de la IHQ convencional (A; 100x) y con la adición del *linker* (B; 100x)..... 76
- Fig. 14: Imagen comparativa de una muestra perteneciente al animal positivo en el test de Roboscreen mediante la aplicación de la IHQ convencional (A; 100x) y la IHQ ultrasensible (B; 100x). 76
- Fig. 15: Inmunomarcaje de PrPsc en placa (A; 100x), en patrón granular (B; 200x) y en patrón difuso (C; 100x) evidenciado por IHQ respecto al patrón difuso observado en el estudio de Capobianco *et al.* (2007; D: 100x)..... 78
- Fig. 16: Localización del inmunomarcaje de PrPsc evidenciado en muchos casos, que parece sugerir una relación con células gliales mediante la inmunohistoquímica convencional (A y B: 50x; C: 200x; D: 400x). 79
- Fig. 17: Imagen comparativa del inmunomarcaje de PrPsc que parece sugerir una posible relación con las células de la glía, en un mismo animal inoculado con la muestra 441, mediante la técnica inmunohistoquímica con los 3 anticuerpos testados: 6H4 (A), R145 (B) y F89 (C; 200x). 79
- Fig. 18: Co-localización de los depósitos de PrPsc en relación con las células de la glía mediante la microscopía confocal. En rojo la proteína PrPsc, en verde las células de la glía y en amarillo la co-localización (100x). 80
- Fig. 19: Imagen de fibrillas SAF evidenciadas en muestras procedentes de ratones inoculados con las muestras bovinas del estudio mediante la técnica de detección de fibrillas SAF por microscopía electrónica (A: 100.000x; B: 150.000x)..... 81
- Fig. 20: Imagen de fibrillas SAF en el ratón positivo por el test de Roboscreen mediante la técnica de detección de fibrillas SAF por microscopía electrónica (A: 100.000x), semejantes a las visualizadas en el estudio de Liberski *et al.* (1991; B: 100.000x). 81
- Fig. 21: Imagen de fibrilla SAF evidenciada en una muestra procedente de un ratón inoculado con una de las muestras bovinas del estudio mediante la técnica de microscopía electrónica con oro coloidal a 250.000x (A); en comparación con las visualizadas en el estudio de Merz *et al.* (1987; B: 143.000x)..... 82

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Diagrama esquemático de la clasificación de las muestras a partir de los resultados obtenidos mediante la técnica del <i>Western blot</i> de diferenciación de Bio-Rad..... | 49 |
| Tabla 2: Recuento de ufc en cada uno de los inóculos correspondientes a cada una de las muestras, a diferentes concentraciones probadas, antes y después del tratamiento térmico..... | 65 |
| Tabla 3: Efecto citopático demostrado sobre las células Vero en función de si habían recibido tratamiento térmico o no y en función de la concentración del inóculo..... | 67 |
| Tabla 4: Efecto de cada dilución del inóculo testada para cada una de las muestras sobre la mortalidad en 48 horas y supervivencia tras 10 días en ratones inoculados para los estudios preliminares realizados..... | 68 |
| Tabla 5: Relación del número de animales inoculados inicialmente para cada muestra y los que finalmente sobrevivieron tras 10 días post-inoculación y que, por lo tanto, pudieron ser valorados e incluidos en el estudio..... | 69 |
| Tabla 6: Relación de animales que presentaron síntomas compatibles con una EET durante la incubación respecto al total de inoculados, así como el tiempo de aparición de los mismos..... | 71 |
| Tabla 7: Relación del número de animales que presentaron un valor ligeramente superior al resto de animales en el test de Roboscreen..... | 72 |
| Tabla 8: Listado de animales que presentaron inmunomarcaje de PrPsc mediante el análisis inmunohistoquímico con 2 ó 3 anticuerpos y, por lo tanto, fueron considerados positivos..... | 75 |
| Tabla 9: Comparativa de los animales que presentaron inmunomarcaje de PrPsc en relación con las secciones analizadas en el análisis inmunohistoquímico con cada uno de los 3 anticuerpos..... | 77 |
| Tabla 10.1: Relación de animales inoculados con cada muestra en función de la presencia de síntomas clínicos y los resultados obtenidos en la IHQ..... | 83 |

INDEX OF FIGURES AND TABLES

INDEX OF FIGURES AND TABLES

LIST OF FIGURES

Fig. 1: Image of a positive and a negative sample after application of Prionics®-Check WESTERN test (European Commission, 1999)42

Fig. 2: Detailed image of the sections provided from each brain corresponding to the animals from bioassay, based on the protocol by Barr et al. (2004)55

Fig. 3: Immunocytochemistry on sample 439 (A), 440 (B), 441 (C), 442 (D), 447 (E) and that from a healthy animal (F; 200x)60

Fig. 4: Comparative image of immunostaining in the bovine sample 442 with the different antibodies: L42 (A), R145 (B) and F89 (C; 200x)61

Fig. 5: Immunostaining in the bovine sample 441 by applying conventional immunocytochemistry (A; 200x) and including a linker (B; 200x)61

Fig. 6: Image provided by the OIE WB technique on the autolytic bovine samples.62

Fig. 7: Glycosylation pattern provided by a BSE, Scrapie and problem (bovine 447) samples by applying the differentiation WB technique with CONTROL (A) and TEST (B) antibodies.....63

Fig. 8: SAF evidenced in the nervous tissue of a bovine sample from the study by electron microscopy (A; 60.000x).....63

Fig. 9: SAF evidenced in the nervous tissue of a bovine sample from the study by electron microscopy marked with colloidal gold at 120.000x (A) in relation with that observed in the study of Merz et al. (1987; B: 143.000x).....64

Fig. 10: Comparative image of particles of colloidal gold observed in bovine samples from this study (250.000x, diameter of the particles of gold = 10 nm, 10A) and in the study of Dourmashkin et al. (2004; 416.000x, diameter of particles of gold = 5 nm, 10B)64

Fig. 11: PrPsc immunostaining in the experimentally inoculated mouse with 440 sample, which resulted positive by Roboscreen test (100x)73

Fig. 12: PrPsc immunostaining in a sample corresponding to an animal from the bioassay inoculated with 439 sample by immunohistochemistry with three different antibodies: 6H4 (A), R145 (B), F89 (C; 100x).....74

Fig. 13: Comparative image of a sample corresponding to the positive mouse by Roboscreen test by applying conventional immunohistochemistry (A; 100x) and including a linker (B; 100x).....76

Fig. 14: Comparative image of a sample corresponding to the positive mouse by Roboscreen test by applying conventional immunohistochemistry (A; 100x) and by applying ultrasensitive immunohistochemistry (B; 100x) 76

Fig. 15: PrPsc immunostaining profile consisting on plaque (A; 100x), granular (B; 200x) and diffuse patterns (C; 100x), and the diffuse pattern observed in the study by Capobianco et al. (2007; D: 100x). 78

Fig. 16: PrPsc immunostaining suggesting a relationship between PrPsc and glial cells by conventional immunohistochemistry (A and B: 50x; C: 200x; D: 400x) ... 79

Fig. 17: PrPsc immunostaining showing its relationship with glial cells in an animal inoculated with 441 bovine sample by immunohistochemistry by applying the three tested antibodies: 6H4 (A), R145 (B) and F89 (C; 200x) 79

Fig. 18: Co-localization of PrPsc deposits and glial cells shown by confocal microscopy. PrPsc (red), glial cells (green) and co-localization (yellow; 100x)..... 80

Fig. 19: SAF visualization in samples from mice inoculated with bovine samples by electron microscopy (A: 100.000x; B: 150.000x) 81

Fig. 20: SAF visualization in the positive mouse by Roboscreen test by applying electron microscopy (A: 100.000x), and those observed by Liberski et al. (1991; B: 100.000x) 81

Fig. 21: SAF visualization in a sample from a mouse inoculated with a bovine sample from the study by electron microscopy marked with colloidal gold (A; 250.000x) and those observed by Merz et al. (1987; B: 143.000x)..... 82

LIST OF TABLES

Table 1: Classification of the samples according to the results provided by differentiation Western blot (Bio-Rad)49

Table 2: Counting of colony-forming unit (CFU) from each inoculum corresponding to every bovine sample inoculated, at different concentrations, before and after heat treatment65

Table 3: Cytotoxic effect showed by each bovine sample tested in Vero cells after heat treatment, depending on the concentration of the inoculum67

Table 4: Effect of each dilution of the inoculum tested for every bovine sample tested on the mortality (in 48 hours) and the survival after 10 days of the inoculated mice assessed in the preliminary studies68

Table 5: Number of inoculated mice for every bovine sample and the final number of mice surviving after 10 days post-inoculation, consequently being included in the study.....69

Table 6: Animals presenting TSE-like clinical signs during the incubation period, respect to the total number of inoculated mice, indicating their appearance time (in months).....71

Table 7: Number of mice showing a value by Roboscreen test slightly higher than the rest of animals.....72

Table8: List of mice which presented deposits of PrPsc by immunohistochemistry by using two or three antibodies, consequently being considered positive samples.....75

Table: 9 Sections from animals presenting PrPsc immunostaining with three different antibodies.....77

Table 10.1: Animals inoculated with each sample presenting clinical signs joint to the respective result provided by immunohistochemistry.....83

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi A, Heikenwalder M, Miele G. 2004. Progress and problems in the biology, diagnostics, and therapeutics of prion diseases. *J Clin Invest* 114:153-160.
- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214:764-766.
- Alpers M, Rail L. 1971. Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: clinical and aetiological aspects. *Proc Aust Assoc Neurol* 8:7-15.
- Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse MEJ, Watt CJ, Udy HJ, MaWinney S, Dunstan SP, Southwood TRE, Wilesmith JW, Ryan JBM, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR, Wells GAH. 1996. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382:779-788.
- Andréoletti O, Berthon P, Levavasseur E, Marc D, Lantier F, Monks E, Elsen JM, Schelcher F. 2002. Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 50:1357-1370.
- Arnold ME, Ryan JB, Konold T, Simmons MM, Spencer YI, Wear A, Chaplin M, Stack M, Czub S, Mueller R, Webb PR, Davis A, Spiropoulos J, Holdaway J, Hawkins SA, Austin AR, Wells GA. 2007. Estimating the temporal relationship between PrP^{Sc} detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy of cattle. *J Gen Virol* 88:3198-3208.
- Arsac JN, Biacabe AG, Nicollo J, Bencsik A, Baron T. 2007. Biochemical identification of bovine spongiform encephalopathies in cattle. *Acta Neuropathol* 114:509-516.
- Asante EA, Linehan JM, Desbrulais M, Joiner S, Gowland I, Wood AL, Welch J, Hill AF, Lloyd SE, Wadsworth JDF, Collinge J. 2002. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J* 21:6358-6366.
- Badiola JJ, Monleón E, Monzón M, Acín C, Luján L, Fernández D, Simmons M, Vargas A. 2002. Description of the first cases of BSE in Spain. *Vet Rec* 151:509-510.
- Baron TG, Madec JY, Calavas D. 1999. Similar signature of the prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy linked diseases. *J Clin Microbiol* 37:3701-3704.
- Baron TG, Madec JY, Calavas D, Richard Y, Barillet F. 2000. Comparison of French natural scrapie isolates with bovine spongiform encephalopathy and experimental scrapie infected sheep. *Neurosci Lett* 284:175-178.

- Baron TG, Biacabe AG. 2001. Molecular analysis of the abnormal prion protein during coinfection of mice by the bovine spongiform encephalopathy agent. *J Virol* 75:107-114.
- Baron T. 2002a. Identification of inter-species transmission of prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:377-383
- Baron T. 2002b. Mouse models of prion disease transmission. *Trends Mol Med* 8: 495-500.
- Baron T, Crozet C, Biacabe AG, Philippe S, Verchere J, Bencsik A, Madec JY, Calavas D, Samarut J. 2004. Molecular analysis of the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *J Virol* 78:6243-6251.
- Baron TG, Biacabe AG, Bencsik A, Langeveld JPM. 2006. Transmission of new bovine prion to mice. *Emerg Infect Dis* 12:1125-1128.
- Barr JB, Somerville RA, Chung YL, Fraser JR. 2004. Microdissection: a method developed to investigate mechanisms involved in transmissible spongiform encephalopathy pathogenesis. *BMC Infect Dis* 4:8.
- Barron RM, Campbell SL, King D, Bellon A, Chapman KE, Williamson RA, Manson JC. 2007. High titers of transmissible spongiform encephalopathy infectivity associated with extremely low levels of PrP^{Sc} in vivo. *J Biol Chem* 282:35878-35886.
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. 1986. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46:417-428.
- Bautista MJ, Gutiérrez J, Salguero FJ, Fernández de Marco MM, Romero-Trevejo JL, Gómez-Villamandos JC. 2006. BSE infection in bovine PrP transgenic mice leads to hyperphosphorylation of tau-protein. *Vet Microbiol* 115:293-301.
- Beck E, Daniel PM, Matthews WB, Stevens DL, Alpers MP, Asher DM, Gajdusek DC, Gibbs Jr CJ. 1969a. Creutzfeldt-Jakob disease. The neuropathology of a transmission experiment. *Brain* 92:699-716.
- Beck E, Daniel PM. 1969b. Degenerative diseases of the central nervous system transmissible to experimental animals. *Postgrad Med J* 45:361-370.
- Bencsik AA, Debeer SO, Baron TG. 2005. An alternative pretreatment procedure in animal transmissible spongiform encephalopathies diagnosis using PrP^{Sc} immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 5:1199-1202.
- Bendheim PE. 1984a. The human spongiform encephalopathies. *Neurol Clin* 2:281-298.
- Bendheim P, Barry RA, DeArmond SJ, Stiles DP, Prusiner SB. 1984b. Antibodies

- to a scrapie prion protein. *Nature* 310:418-421.
- Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153:202-208.
- Bergström AL, Jensen TK, Heegaard PM, Cordes H, Hansen VB, Laursen H, Lind P. 2006. Short-term study of the uptake of PrP(Sc) by the Peyer's patches in hamsters after oral exposure to scrapie. *J Comp Pathol* 134:126-133.
- Bessen RA, Marsh, RF. 1994. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68:7859-7868.
- Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. 2004. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep* 5:110-115.
- Bishop MT, Hart P, Aitchison L, Baybutt HN, Plinston C, Thomson V, Tuzi NL, Head MW, Ironside JW, Will RG, Manson JC. 2006. Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol* 5:393-398.
- Blättler T, Brandner S, Raeber AJ, Klein MA, Voigtländer T, Weissmann C, Aguzzi A. 1997. PrP-expressing tissue required for transfer of scrapie infectivity from spleen to brain. *Nature* 389:69-73.
- Bode L, Pocchiari M, Gelderblom H, Diring H. 1985. Characterization of antisera against scrapie-associated fibrils (SAF) from affected hamster and cross-reactivity with SAF from scrapie-affected mice and from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Gen Virol* 66:2471-2478.
- Bolea R, Monleón E, Schiller I, Raeber AJ, Acín C, Monzón M, Martín-Burriel I, Struckmeyer T, Oesch B, Badiola JJ. 2005. Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest* 17:467-469.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218:1309-1311.
- Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. 1984. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry* 23:5898-5906.
- Bolton DC, Meyer RK, Prusiner SB. 1985. Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J Virol* 53:596-606.
- Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB. 1990. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110:743-752.
- Bradley R. 1999. BSE transmission studies with particular reference to blood. *Dev*

- Biol Stand 99:35-40.
- Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A. 1996. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379:339-343.
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. 1997. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390:684-687.
- Brown DA, Bruce ME, Fraser JR. 2003. Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 29:262-272.
- Bruce ME. 1981. Serial studies on the development of cerebral amyloidosis and vacuolar degeneration in murine scrapie. *J Comp Pathol* 91:589-597.
- Bruce ME, Fraser H. 1982. Effects of age on cerebral amyloid plaques in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 8:71-74.
- Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF. 1989. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 102:1-6.
- Bruce ME, McConnell I, Fraser H, Dickinson AG. 1991. The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J Gen Virol* 72:595-603.
- Bruce M, Chree A, McConnell I, Foster J, Pearson G, Fraser H. 1994. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Phil Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343:405-411.
- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. 1997. Transmissions to mice indicate that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389:498-501.
- Bruce ME. TSE strain variation. 2003. *Br Med Bull* 66:99-108.
- Büeler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. 1994. High prion and PrP^{sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* 1:19-30.
- Buschmann A, Pfaff E, Reifenberg K, Müller HM, Groschup MH. 2000. Detection of cattle-derived BSE prions using transgenic mice overexpressing bovine PrP^c. *Arch Virol Suppl* 16:75-86.
- Buschmann A, Lühken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup MH. 2004. Neuronal

- accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol* 85:2727-2733.
- Buschmann A, Groschup MH. 2005. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis* 192:934-942.
- Buschmann A, Gretzschel A, Biacabe AG, Schiebel K, Corona C, Hoffmann C, Eiden M, Baron T, Casalone C, Groschup MH. 2006. Atypical BSE in Germany-proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol* 117:103-116.
- Capobianco R, Casalone C, Suardi S, Mangieri M, Miccolo C, Limido L, Catania M, Rossi G, Di Fede G, Giaccone G, Bruzzone MG, Minati L, Corona C, Acutis P, Gelmetti D, Lombardi G, Groschup MH, Buschmann A, Zanusso G, Monaco S, Caramelli M, Tagliavini F. 2007. Conversion of the BASE Prion Strain into the BSE Strain: The Origin of BSE? *PLoS Pathog* 3:e31.
- Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, Coleman S, Marshall ST, DeArmond SJ, Westaway D, Prusiner SB. 1986. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell* 46:503-511.
- Carra E, Taddei R, Barbieri I, Botti G, Tranquillo V, Iori A, Gibelli L, Cerioli M, Cavadini P, Gelmetti D, Pongolini S, Capucci L. 2009. Evaluation of three rapid diagnostic tests used in bovine spongiform encephalopathy monitoring in Italy. *J Vet Diagn Invest* 21:830-836.
- Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. 2004. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci US* 101:3065-3070.
- Casalone C, Caramelli M, Crescio MI, Spencer YI, Simmons MM. 2006. BSE immunohistochemical patterns in the brainstem: a comparison between UK and Italian cases. *Acta Neuropathol* 111:444-449.
- Castellanos A, Pérez Prieto M, Castrodeza J, Mirón Canelo JA, González-Sarmiento R. 2010. M129V PRNP gene polymorphism in Castilla y León shows a similar distribution to other Spanish regions and other European countries. *Med Clin (Barc)* 134:254-256.
- Castilla J, Gutiérrez Adán A, Brun A, Pintado B, Ramírez MA, Parra B, Doyle D, Rogers M, Salguero FJ, Sánchez C, Sánchez-Vizcaíno JM, Torres JM. 2003. Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol* 148: 677-691.
- Caughey B, Raymond GJ. 1991. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266:18217-18223.
- Caughey B, Chesebro B. 1997. Prion protein and the transmissible spongiform

- encephalopathies. *Trends Cell Biol* 7:56-62.
- Chaplin MJ, Barlow N, Ryder S, Simmons MM, Spencer Y, Hughes R, Stack MJ. 2002. Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrP(Sc) by immunoblotting and immunohistochemistry from natural cases of scrapie and BSE. *Res Vet Sci* 72:37-43.
- Chen SG, Gambetti P. 2002. A journey through the species barrier. *Neuron* 34: 854-856.
- Chesebro B. 2003. Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* 66:1-20.
- Cho HJ. 1986. Antibody to scrapie-associated fibril protein identifies a cellular antigen. *J Gen Virol* 67:243-253.
- Cockcroft PD. 2004. The similarity of the physical sign frequencies of bovine spongiform encephalopathy and selected differential diagnoses. *Vet J* 167:175-180.
- Collinge J, Harding AE, Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Boughy AM, Shah T, Crow TJ. 1989. Diagnosis of Gerstmann-Straussler syndrome in familial dementia with prion protein gene analysis. *Lancet* 2:15-17.
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. 1994. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370:295-297.
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature* 383:685-690.
- Collinge J. 1997. Human prion diseases and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Hum Mol Genet* 6:1699-1705.
- Collinge J, Clarke AR. 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318:930-936.
- Collins PS, Lawson VA, Masters PC. 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363:51-61.
- Comoy EE, Casalone C, Lescoutra-Etcheagaray N, Zanusso G, Freire S, Marcé D, Auvré F, Ruchoux MM, Ferrari S, Monaco S, Salès N, Caramelli M, Leboulch P, Brown P, Lasmézas CI, Deslys JP. 2008. Atypical BSE (BASE) transmitted from asymptomatic aging cattle to a primate. *PLoS One* 3:e3017.
- Cooley WA, Clark JK, Stack MJ. 1998. Comparison of scrapie-associated fibril detection and Western immunoblotting for the diagnosis of natural ovine scrapie. *J Comp Pathol* 118:41-49.

- Cooley WA, Clark JK, Ryder SJ, Davis LA, Farrelly SS, Stack MJ. 2001. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J Comp Pathol* 12:64-70.
- Cordier C, Bencsik A, Philippe S, Bétemps D, Ronzon F, Calavas D, Crozet C, Baron T. 2006. Transmission and characterization of bovine spongiform encephalopathy sources in two ovine transgenic mouse lines (TgOvPrP4 and TgOvPrP59). *J Gen Virol* 87:3763-3771.
- Costa C, Tortosa R, Vidal E, Padilla D, Torres JM, Ferrer I, Pumarola M, Bassols A. 2009. Central nervous system extracellular matrix changes in a transgenic mouse model of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J* 182:306-314.
- Crozet C, Bencsik A, Flamant F, Lezmi S, Samarut J, Baron T. 2001. Florid plaques in ovine PrP transgenic mice infected with an experimental ovine BSE. *EMBO Rep* 2:952-956.
- Curin Serbec V, Bresjanac M, Popovic M, Pretnar Hartman K, Galvani V, Ruprecht R, Cernilec M, Vranac T, Hafner I, Jerala R. 2004. Monoclonal antibody against a peptide of human prion protein discriminates between Creutzfeldt-Jacob's disease-affected and normal brain tissue. *J Biol Chem* 279:3694-3698.
- Dawson M, Mansley LM, Hunter AR, Stack MJ, Scott AC. 1987. Comparison of scrapie-associated fibril detection and histology in the diagnosis of natural sheep scrapie. *Vet Rec* 121:591.
- Dawson M, Wells GAH, Parker BNJ. 1990. Preliminary evidence of the experimental transmissibility of bovine spongiform encephalopathy to cattle. *Vet Rec* 126:112-113.
- DeArmond SJ, McKinley MP, Barry RA, Braunfeld MB, McColloch JR, Prusiner SB. 1985. Identification of prion amyloid filaments in scrapie-infected brain. *Cell* 41:221-235.
- DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB. 1987. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 37:1271-1280.
- Debeer SO, Baron TG, Bencsik AA. 2001. Immunohistochemistry of PrPsc within bovine spongiform encephalopathy brain samples with graded autolysis. *J Histochem Cytochem* 49:1519-1524.
- Debeer SO, Baron TG, Bencsik AA. 2002. Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrPsc immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J Histochem Cytochem* 5:611-616.
- Debeer S, Baron T, Bencsik A. 2003. Neuropathological characterisation of French bovine spongiform encephalopathy cases. *Histochem Cell Biol* 120:513-521.

- Dell'Omo G, Vannoni E, Vyssotski AL, Di Bari MA, Nonno R, Agrimi U, Lipp HP. 2002. Early behavioural changes in mice infected with BSE and scrapie: automated home cage monitoring reveals prion strain differences. *Eur J Neurosci* 16:735-742.
- Díaz-San Segundo F, Salguero FJ, de Avila A, Espinosa JC, Torres JM, Brun A. 2006. Distribution of the cellular prion protein (PrPC) in brains of livestock and domesticated species. *Acta Neuropathol* 112:587-595.
- Dickinson AG, Meikle VM, Fraser H. 1968. Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J Comp Pathol* 78:293-299.
- Dickinson AG, Meikle VM. 1969. A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genet Res* 13:213-225.
- Di Fede G, Giaccone G, Limido L, Mangieri M, Suardi S, Puoti G, Morbin M, Mazzoleni G, Ghetti B, Tagliavini F. 2007. The E isoform of 14-3-3 proteína is a component of the prion proteína amyloid deposits of Gerstmann-Straüsler-Scheinker disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 66:124-130.
- Diringer H, Gelderblom H, Hilmert H, Ozel M, Edelbluth C, Kimberlin RH. 1983. Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* 306:476-478.
- Doerr-Schott J, Kitamoto T, Tateishi J, Boellaard JW, Heldt N, Lichte C. 1990. Immunogold light and electron microscopic detection of amyloid plaques in transmissible spongiform encephalopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 16:85-89.
- Doherr MG, Heim D, Fatzer R, Cohen CH, Vandeveld M, Zurbriggen A. 2001. Targeted screening of high-risk cattle populations for BSE to augment mandatory reporting of clinical suspects. *Prev Vet Med* 51:3-16.
- Dourmashkin RR, Oxford JS, Bountiff L. 2004. Immunogold electron microscopy recognizes prion protein-associated particles prepared from scrapie-infected mouse brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:32-42.
- EFSA, European Food Safety Authority. 2005. Opinion of the Scientific Panel on biological hazards (BIOHAZ) on the "Quantitative risk assessment of the animal BSE risk posed by meat and bone meal with respect to the residual BSE risk" (July 2005).
- Eisele YS, Bolmont T, Heikenwalder M, Langer F, Jacobson LH, Yan ZX, Roth K, Aguzzi A, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. 2009. Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic A β inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12926-12931.
- Ersdal C, Simmons MM, Goodsir C, Martín S, Jeffrey M. 2003. Sub-cellular pathology of scrapie: coated pits are increased in PrP codon 136 alanine

- homozygous scrapie-affected sheep. *Acta Neuropathol* 106:17-28.
- Espinosa JC, Andréoletti O, Castilla J, Herva ME, Morales M, Alamillo E, San-Segundo FD, Lacroux C, Lugan S, Salguero FJ, Langeveld J, Torres JM. 2007. Sheep-Passaged Bovine Spongiform Encephalopathy Agent Exhibits Altered Pathobiological Properties in Bovine-PrP Transgenic Mice. *J Virol* 81:835-843.
- European Commission 1999. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines.
- European Commission 2001. Regulation (EC) No 999/2001 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2001: laying down rules for the prevention control and eradication of certain transmissible spongiform encephalopathies.
- European Commission 2004. The field trial of seven new rapid post mortem tests for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy in bovines.
- Eurosurveillance 2005. BSE agent in goat tissue: first known naturally occurring case confirmed. *Europe's journal on infectious disease epidemiology, prevention and control. Euro Surveill* 10:E050203.1.
- Farquhar CF, Dornan J, Moore RC, Somerville RA, Tunstall AM, Hope J. 1996. Protease-resistant PrP deposition in brain and non-central nervous system tissues of a murine model of bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 77:1941-1946.
- Fix AS, Garman RH. 2000. Practical aspects of neuropathology: a technical guide for working with the nervous system. *Toxicol Pathol* 28:122-131.
- Foster JD, Hope J, Fraser H. 1993. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec* 133:339-341.
- Foster JD, Parnham D, Chong A, Goldmann W, Hunter N. 2001. Clinical signs histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet Rec* 148:165-171.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O. 1995. Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *CR Acad Sci III* 318:339-344.
- Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O, Lasmézas CI, Deslys JP, Dormont D, Brown P. 1998. Distribution and submicroscopic immunogold localization of cellular prion protein (PrP_c) in extracerebral tissues. *Cell Tissue Res* 292:77-84.
- Fraser H, Dickinson AG. 1968. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol* 78:301-311.
- Fraser H, Dickinson AG. 1973. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the

- distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* 83:29-40.
- Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA. 1992. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol* 73:1891-1897.
- Fraser H. 1993. Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull* 49:792-809.
- Frigg R, Klein MA, Hegyi I, Zinkernagel RM, Aguzzi A. 1999. Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. *J Virol* 73:9584-9588.
- Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alshekhlee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D, Belay ED, Schonberger LB, Marder K, Harris C, Burke JR, Montine T, Wisniewski T, Dickson DW, Soto C, Hulette CM, Mastrianni JA, Kong Q, Zou WQ. 2008. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol* 63:697-708.
- Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. 2005. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest* 17:509-527.
- Gavier-Widén D, Nöremark M, Langeveld JP, Stack M, Biacabe AG, Vulin J, Chaplin M, Richt JA, Jacobs J, Acín C, Monleón E, Renström L, Klingeborn B, Baron TG. 2008. Bovine spongiform encephalopathy in Sweden: an H-type variant. *J Vet Diagn Invest* 20:2-10.
- Giaccone G, Canciani B, Puoti G, Rossi G, Goffredo D, Iussich S, Fociani P, Tagliavini F, Bugiani O. 2000. Creutzfeldt-Jakob disease: Carnoy's fixative improves the immunohistochemistry of the proteinase K-resistant prion protein. *Brain Pathol* 10:31-37.
- Gibson PH, Somerville RA, Fraser H, Foster JD, Kimberlin RH. 1987. Scrapie-associated fibrils in the diagnosis of scrapie in sheep. *Vet Rec* 120:125-127.
- González L, Martin S, Jeffrey M. 2003. Distinct profiles of PrP^d immunoreactivity in the brain of scrapie and BSE infected sheep: implications on differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol* 84:1339-1350.
- González L, Terry L, Jeffrey M. 2005. Expression of prion protein in the gut of mice infected orally with the 301V murine strain of the bovine spongiform encephalopathy agent. *J Comp Pathol* 132:273-282.
- Gordon WS. 1966. Report of scrapie seminar held at Washington DC, January 1964. En: ARS 91-53. Department of Agriculture. Washington DC, US p.8.
- Graber HU, Meyer RK, Fatzer R, Vandeveld M, Zurbriggen A. 1995. In situ hybridization and immunohistochemistry for prion protein (PrP) in bovine

- spongiform encephalopathy (BSE). *Zentralbl Veterinarmed A* 42:453-459.
- Grassi J, Comoy E, Simon S, Créminon C, Frobert Y, Trapmann S, Schimmel H, Hawkins SA, Moynagh J, Deslys JP, Wells GA. 2001. Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet Rec* 149:577-582.
- Grassi J. 2003. Pre-clinical diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies using rapid tests. *Transfus Clin Biol* 1:19-22.
- Grassi J, Maillet S, Simon S, Morel N. 2008. Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res* 39:33.
- Gray JG, Dudas S, Czub S. 2011. A study on the analytical sensitivity of 6 BSE tests used by the Canadian BSE reference laboratory. *PLoS One* 6:e17633.
- Green R, Horrocks C, Wilkinson A, Hawkins SA, Ryder SJ. 2005. Primary isolation of the bovine spongiform encephalopathy agent in mice: agent definition based on a review of 150 transmissions. *J Comp Pathol* 132:117-131.
- Griffith JS. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature* 215:1043-1044.
- Gubler E, Hilbe M, Ehrensperger F. 2007. Lesion profiles and gliosis in the brainstem of 135 Swiss cows with bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Schweiz Arch Tierheilkd* 149:111-122.
- Hagiwara K, Yamakawa Y, Sato Y, Nakamura Y, Tobiume M, Shinagawa M, Sata T. 2007. Accumulation of mono-glycosylated form-rich, plaque-forming PrP in the second atypical bovine spongiform encephalopathy case in Japan. *Jpn J Infect Dis* 60:305-308.
- Hardt M, Baron T, Groschup MH. 2000. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 122:43-53.
- Harris DA. 2004. Mad cow disease and related spongiform encephalopathies. Springer Verlag GmbH & Co.Kg. (ISBN:9783540201076).
- Hayashi H, Takata M, Iwamaru Y, Ushiki Y, Kimura KM, Tagawa Y, Shinagawa M, Yokoyama T. 2004. Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein. *J Vet Med Sci* 66:515-520.
- Hilmert H, Diringier H. 1984. A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters. *Biosci Rep* 4:165-170.
- Hilton DA, Ghani AC, Conyers L, Edwards P, McCardle L, Ritchie D, Penney M, Hegazy D, Ironside JW. 2004. Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol* 203:733-739.
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, Caollinge J, Doey LJ,

- Lantos P. 1997. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389:448-450, 526.
- Hill AF, Antoniou M, Collinge J. 1999. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* 80:11-14.
- Hill AF, Joiner S, Linehan J, Desbruslais M, Lantos PL, Collinge J. 2000. Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10248-10253.
- Hoffmann C, Ziegler U, Buschmann A, Weber A, Kupfer L, Oelschlegel A, Hammerschmidt B, Groschup MH. 2007. Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 88:1048-1055.
- Hope J, Morton LJD, Farquhar CF, Multhaup G, Beyreuther K, Kimberlin RH. 1986. The major polypeptide of scrapie associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J* 5:2591-2597.
- Hope J, Reekie LJ, Hunter N, Multhaup G, Beyreuther K, White H, Scott AC, Stack MJ, Dawson M, Wells GA. 1988. Fibrils from brains of cows with new cattle disease contain scrapie-associated fibrils. *Nature* 336:390-392.
- Hope J, Ritchie L, Farquhar C, Somerville R, Hunter N. 1989. Bovine spongiform encephalopathy: a scrapie-like disease of British cattle. *Prog Clin Biol Res* 317:659-667.
- Hope J, Wood SC, Birkett CR, Chong A, Bruce ME, Cairns D, Goldmann W, Hunter N, Bostock CJ. 1999. Molecular analysis of ovine prion protein identifies similarities between BSE and an experimental isolate of natural scrapie, CH1641. *J Gen Virol* 80:1-4.
- Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. 2000. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356:999-1000.
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. 2002. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol* 83:2897-2905.
- Ironside JW, McCardle L, Horsburgh A, Lim Z, Head MW. 2002. Pathological diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *APMIS* 110:79-87.
- Iwamaru Y, Okubo Y, Ikeda T, Hayashi H, Imamura M, Yokoyama T, Shinagawa M. 2005. PrP^{Sc} distribution of a natural case of bovine spongiform encephalopathy. En: *Prions: Food and Drug Safety*. Eds: Kitamoto T. Srpinger Verlag, Tokyo.
- Iwata N, Sato Y, Higuchi Y, Nohtomi K, Nagata N, Hasegawa H, Tobiume M, Nakamura Y, Hagiwara K, Furuoka H, Horiuchi M, Yamakawa Y, Sata T. 2006. Distribution of PrP in cattle with bovine spongiform

- encephalopathy slaughtered at abattoirs in Japan. *J Infect Dis* 59:100-107.
- Jacobs JG, Langeveld JP, Biacabe AG, Acutis PL, Polak MP, Gavier-Widen D, Buschmann A, Caramelli M, Casalone C, Mazza M, Groschup M, Erkens JH, Davidse A, van Zijderveld FG, Baron T. 2007. Molecular discrimination of atypical bovine spongiform encephalopathy strains from a geographical region spanning a wide area in Europe. *J Clin Microbiol* 45:1821-1829.
- Jeffrey M. 1990. Neurohistopathological observations on bovine spongiform encephalopathy submissions in Scotland. *State Vet J* 44:151-159.
- Jeffrey M, Scott JR, Williams A, Fraser H. 1992. Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol* 84:559-569.
- Jeffrey M, Goodsir CM, Bruce ME, McBride PA, Farquhar C. 1994. Morphogenesis of amyloid plaques in 87V murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:535-542.
- Jeffrey M, Halliday WG. 1994. Numbers of neurons in vacuolated and non-vacuolated neuroanatomical nuclei in bovine spongiform encephalopathy-affected brains. *J Comp Path* 110:287-293.
- Jeffrey M, Goodbrand IA, Goodsir CM. 1995. Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructures. *Micron* 26:277-298.
- Jeffrey M, Goodsir CM, Fowler N, Hope J, Bruce ME, McBride PA. 1996. Ultrastructural immuno-localization of synthetic prion protein peptide antibodies in 87V murine scrapie. *Neurodegeneration* 5:101-109.
- Jeffrey M, Martin S, González L, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Jackman R. 2001. Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J Comp Pathol* 125:271-284.
- Jeffrey M, McGovern G, Goodsir CM, Sisó S, González L. 2009. Strain-associated variations in abnormal PrP trafficking of sheep scrapie. *Brain Pathol* 19:1-11.
- Jeffrey M, McGovern G, Sisó S, González L. 2010. Cellular and sub-cellular pathology of animal prion diseases: relationship between morphological changes, acumulación of abnormal prion protein and clinical disease. *Acta Neuropathol* 121:113-134.
- Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Wisniewski HM, Diringer H. 1985. Biochemical differences among scrapie associated fibrils support the biological diversity of scrapie agents. *J Gen Virol* 66:1715-1722.
- Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Robakis NK, Wisniewski HM, Diringer H. 1986. Immunological comparison of scrapie-associated fibrils

- isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol* 59:676-683.
- Katz JB, Pedersen JC, Jenny AL, Taylor WD. 1992. Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Diagn Invest* 4:447-449.
- Kimura K, Haritani M. 2008. Distribution of accumulated prion protein in a cow with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 162:822-825.
- Kimberlin RH, Walker CA. 1977. Characteristics of a short incubation model of scrapie in the golden hamster. *J Gen Virol* 34:295-304.
- Kimberlin RH. 1993. Bovine spongiform encephalopathy: an appraisal of the current epidemic in the United Kingdom. *Intervirology* 35:208-218.
- Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T, Tateishi J. 1992. Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 140:1285-1294.
- Konold T, Bone G, Ryder S, Hawkins SA, Courtin F, Berthelin-Baker C. 2004. Clinical findings in 78 suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. *Vet Rec* 155:659-666.
- Konold T, Bone G, Vidal-Diez A, Tortosa R, Davis A, Dexter G, Hill P, Jeffrey M, Simmons MM, Chaplin MJ, Bellworthy SJ, Berthelin-Baker C. 2008. Pruritus is a common feature in sheep infected with the BSE agent. *BMC Vet Res* 4:16.
- Koo HC, Park YH, Lee BC, Chae C, O'Rourke KI, Baszler TV. 2001. Immunohistochemical detection of Prion protein (PrP-Sc) and epidemiological study of BSE in Korea. *J Vet Sci* 2:25-31.
- Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. 1986. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122:1-5.
- Kübler E, Oesch B, Raeber AJ. 2003. Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull* 66:267-279.
- Kuczius T, Groschup MH. 1999. Differences in proteinase K resistance and neuronal deposition of abnormal prion proteins characterize bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie strains. *Mol Med* 5:406-418.
- Lasmézas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Hauw JJ, Dormont D. 1996. Strain specific and common pathogenic events in murine models of scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 77:1601-1609.
- Lasmézas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D. 1997. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275:402-405.

- Lasmézas CI, Fournier JG, Nouvel V, Boe H, Marcé D, Lamoury F, Kopp N, Hauw JJ, Ironside J, Bruce M, Dormont D, Deslys JP. 2001. Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4142-4147.
- Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* 305:673-676.
- Lezmi S, Martin S, Simon S, Comoy E, Bencsik A, Deslys JP, Grassi J, Jeffrey M, Baron T. 2004. Comparative molecular analysis of the abnormal prion protein in field scrapie cases and experimental bovine spongiform encephalopathy in sheep by use of Western blotting and immunohistochemical method. *J Virol* 78:3654-3662.
- Liberski PP, Yanagihara R, Asher DM, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. 1990. Re-evaluation of the ultrastructural pathology of experimental Creutzfeldt-Jakob disease. Serial studies of the Fujisaki strain of Creutzfeldt-Jakob disease virus in mice. *Brain* 113:121-137.
- Liberski PP, Brown P, Sfiu-Yan X, Gajdusek DC. 1991. The ultrastructural diversity of scrapie-associated fibrils isolated from experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *J Comp Pathol* 105:377-386.
- Liberski PP, Jeffrey M, Goodsir C. 1997. Tubulovesicular structures are not labeled using antibodies to prion protein (PrP) with the immunogold electron microscopy techniques. *Acta neuropathol* 93:260-264.
- Liu WG, Brown DA, Fraser JR. 2003. Immunohistochemical comparison of anti-prion protein (PrP) antibodies in the CNS of mice infected with scrapie. *J Histochem Cytochem* 51:1065-1071.
- Lloyd SE, Linehan JM, Desbruslais M, Joiner S, Buckell J, Brandner S, Wadsworth JD, Collinge J. 2004. Characterization of two distinct prion strains derived from bovine spongiform encephalopathy transmissions to inbred mice. *J Gen Virol* 85:2471-2478.
- Loiacono CM, Beckwith N, Kunkle RA, Orcutt D, Hall SM. 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* 22:684-689.
- Lombardi G, Casalone C, D' Angelo A, Gelmetti D, Torcoli G, Barbieri I, Corona C, Fasoli E, Farinazzo A, Fiorini M, Gelati M, Iulini B, Tagliavini F, Ferrari S, Caramelli M, Monaco S, Capucci L, Zanusso G. 2008. Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathog* 4:e1000075.
- Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K. 2000. NMR structure of the bovine prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8334-8339.

- Mallucci G, Dickinson A, Linehan J, Klöhn PC, Brandner S, Collinge J. 2003. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302:871-874.
- Manning L, O'Rourke KI, Knowles DP, Marsh SA, Spencer YI, Moffat E, Wells GA, Czub S. 2008. A collaborative Canadian-United Kingdom evaluation of an immunohistochemistry protocol to diagnose bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Diagn Invest* 20:504-508.
- Manetto V, Medori R, Cortelli P, Montagna P, Tinuper P, Baruzzi A, Rancurel G, Hauw JJ, Vanderhaeghen JJ, Maillieux P. 1992. Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 42:312-319.
- Manson JC, Jamieson E, Baybutt H, Tuzi NL, Barron R, McConnell I, Somerville R, Ironside J, Will R, Sy MS, Melton DW, Hope J, Bostock C. 1999. A single amino acid alteration (101L) introduced into murine PrP dramatically alters incubation time of transmissible spongiform encephalopathy. *EMBO J* 18:6855-6864.
- Manuelidis L, Zaitsev I, Koni P, Lu ZY, Flavell RA, Fritch W. 2000. Follicular dendritic cells and dissemination of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 74:8614-8622.
- Martin S, González L, Chong A, Houston FE, Hunter N, Jeffrey M. 2005. Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 86:839-848.
- Masujin K, Shu Y, Yamakawa Y, Hagiwara K, Sata T, Matsuura Y, Iwamaru Y, Imamura M, Okada H, Mohri S, Yokoyama T. 2008. Biological and biochemical characterization of L-type-like bovine spongiform encephalopathy (BSE) detected in Japanese black beef cattle. *Prion* 2:123-128.
- McGill IS, Wells GA. 1993. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Comp Pathol* 108:241-260.
- McKinley MP, Meyer RK, Kenaga L, Rahbar F, Cotter R, Serban A, Prusiner SB. 1991. Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* 65:1340-1351.
- Medori R, Montagna P, Tritschler HJ, LeBlanc A, Cortelli P, Tinuper P, Lugaresi E, Gambetti P. 1992. Fatal familial insomnia: a second kindred with mutation of prion protein gene at codon 178. *Neurology* 42:669-670.
- Meloni D, Varello K, Pezzolato M, Manzardo E, Cavarretta MC, Ingravalle F, Caramelli M, Bozzetta E. 2010. Effect of autolysis on the specificity of bovine spongiform encephalopathy rapid tests. *BMC Res Notes* 3:193.
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Iqbal K. 1981. Abnormal fibrils from

- scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol* 54:63-74.
- Merz PA, Somerville RA, Wisniewski HM, Manuelidis L, Manuelidis EE. 1983. Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 306:474-476.
- Merz PA, Rohwer RG, Kascsak R, Wisniewski HM, Somerville RA, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. 1984. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* 225:437-440.
- Merz PA, Kascsak RJ, Rubenstein R, Carp RI, Wisniewski HM. 1987. Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie-associated fibrils. *J Virol* 61:42-49.
- Meyer RK, McKinley MP, Bowman K, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2310-2314.
- Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M. 2006. Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784.
- Miller JM, Jenny AL, Taylor WD, Marsh RF, Rubenstein R, Race RE. 1993. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* 5:309-316.
- Miller JM, Jenny AL, Taylor WD, Race RE, Ernst DR, Katz JB, Rubenstein R. 1994. Detection of prion protein in formalin fixed brain by hydrated autoclaving immunohistochemistry for the diagnosis of scrapie in sheep. *J Vet Diagn Invest* 6:366-368.
- Miyashita M, Stierstorfer B, Schmahl W. 2004. Neuropathological findings in brains of Bavarian cattle clinically suspected of bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Publ Health* 51:209-215.
- Monleón E, Monzón M, Hortells P, Vargas A, Badiola JJ. 2003. Detection of PrP(sc) in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 51:15-18.
- Monleón E, Garza MC, Sarasa R, Alvarez-Rodriguez J, Bolea R, Monzón M, Vargas MA, Badiola JJ, Acín 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.
- Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW, Manson JC. 1998. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet* 18:118-125.
- Moore RA, Vorberg I, Priola SA. 2005. Species barriers in prion diseases-brief

- review. *Arch Virol Suppl*:187-202.
- Moore SJ, Simmons M, Chaplin M, Spiropoulos J. 2008. Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain *Acta Neuropathol* 116:547-559.
- Morignat E, Ducrot C, Roy P, Baron T, Vinard JL, Biacabe AG, Madec JY, Bencsik A, Debeer S, Eliazsewicz M, Calavas D. 2002. Targeted surveillance to assess the prevalence of BSE in high-risk populations in western France and the associated risk factors. *Vet Rec* 151:73-77.
- Moynagh J, Schimmel H. 1999. Tests for BSE evaluated. Bovine spongiform encephalopathy. *Nature* 400:105.
- Multhaup G, Diringer H, Hilmert H, Prinz H, Heukeshoven J, Beyreuther K. 1985. The protein component of scrapie-associated fibrils is a glycosylated low molecular weight protein. *EMBO J* 4:1495-1501.
- Muramoto T, Kitamoto T, Tateishi J, Goto I. 1992. The sequential development of abnormal prion protein accumulation in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 140:1411-1420.
- Nagele RG, Wegiel J, Venkataraman V, Imaki H, Wang KC, Wegiel J. 2004. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 25:663-674.
- Narang HK, Perry RH. 1990. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by electron microscopy. *Lancet* 335:663-664.
- Nathanson N, Wilesmith J, Griot C. 1997. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): causes and consequences of a common source epidemic. *Am J Epidemiol* 145:959-969.
- Nazor KE, Kuhn F, Seward T, Green M, Zwald D, Pürro M, Schmid J, Biffiger K, Power AM, Oesch B, Raeber AJ, Telling GC. 2005. Immunodetection of disease-associated mutant PrP, which accelerates disease in GSS transgenic mice. *EMBO J* 24:2472-2480.
- Nentwig A, Oevermann A, Heim D, Botteron C, Zellweger K, Drögemüller C, Zurbriggen A, Seuberlich T. 2007. Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog* 3:e82.
- Nguyen J, Baldwin MA, Cohen FE, Prusiner SB. 1995. Prion protein peptides induce alpha-helix to beta-sheet conformational transitions. *Biochemistry* 34:4186-4192.
- Novakofski J, Brewer MS, Mateus-Pinilla N, Killefer J, McCusker RH. 2005. Prion biology relevant to bovine spongiform encephalopathy. *J Anim Sci* 83:1455-1476.

- Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, Prusiner SB, Weissmann C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40:735-746.
- Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandevelde M, Moser M. 2000. Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol Suppl* 189-195.
- Onnasch H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL, Bassett HF. 2004. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec* 155:636-637.
- Orge L, Simas JP, Fernandes AC, Ramos M, Galo A. 2000. Similarity of the lesion profile of BSE in Portuguese cattle to that described in British cattle. *Vet Rec* 147: 486-488.
- Ozawa Y. 2007. Bovine spongiform encephalopathy in Japan and options for control. *Vet Ital* 43:21-32.
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, Prusiner SB. 1993. Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962-10966.
- Paramithiotis E, Pinard M, Lawton T, LaBoissiere S, Leathers VL, Zou WQ, Estey LA, Lamontagne J, Lehto MT, Kondejewski LH, Francoeur GP, Papadopoulos M, Haghghat A, Spatz SJ, Head M, Will R, Ironside J, O'Rourke K, Tonelli Q, Ledebur HC, Chakrabarty A, Cashman NR. 2003. A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation. *Nat Med* 9:893-899.
- Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Head MW, Ironside JW, Gambetti P, Chen SG. 2000. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:10168-10172.
- Pastrana MA, Sajnani G, Onisko B, Castilla J, Morales R, Soto C, Requena JR. 2006. Isolation and characterization of a proteinase K-sensitive PrP^{Sc} fraction. *Biochemistry* 45:15710-15717.
- Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. 2004. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364:527-529.
- Peretz D, Williamson RA, Matsunaga Y, Serban H, Pinilla C, Bastidas RB, Rozenshteyn R, James TL, Houghten RA, Cohen FE, Prusiner SB, Burton DR. 1997. A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform. *J Mol Biol* 273:614-622.
- Peretz D, Williamson RA, Legname G, Matsunaga Y, Vergara J, Burton DR, DeArmond SJ, Prusiner SB, Scott MR. 2002. A change in the conformation

- of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 34:921-932.
- Piccardo P, Manson JC, King D, Ghetti B, Barron RM. 2007. Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:4712-4717.
- Plinston C, Hart P, Chong A, Hunter N, Foster J, Piccardo P, Manson JC, Barron RM. 2011. Increased susceptibility of human-PrP transgenic mice to bovine spongiform encephalopathy infection following passage in sheep. *J Virol* 85:1174-1181.
- Polak M, Larska M, Rozec W, Zmudzinski. 2003. Usefulness of rapid tests for diagnosis of BSE. *Bull Vet Inst Pulawy* 47:89-93.
- Polak M, W. Rozek, J. Rola, and J. F. Zmudzinski. 2004. Prion protein glycoforms from BSE cases in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 48:201-205.
- Polak MP, Zmudzinski JF. 2012. Distribution of a pathological form of prion protein in the brainstem and cerebellum in classical and atypical cases of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J* 191:128-130.
- Pomfrett CJ, Glover DG, Pollard BJ. 2007. The vagus nerve as a conduit for neuroinvasion, a diagnostic tool, and a therapeutic pathway for transmissible spongiform encephalopathies, including variant Creutzfeldt Jacob disease. *Med Hypotheses* 68:1252-1257.
- Prusiner SB, Cochran SP, Groth DF, Downey DE, Bowman KA, Martinez HM. 1982. Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann Neurol* 11:353-358.
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG. 1983. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35:349-358.
- Prusiner SB. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science* 252:1515-1522.
- Prusiner SB, Fūzi M, Scott M, Serban D, Serban H, Taraboulos A, Gabriel JM, Wells GA, Wilesmith JW, Bradley R, DeArmond SJ, Kristensson K. 1993. Immunologic and molecular biologic studies of prion proteins in bovine spongiform encephalopathy. *J Infect Dis* 167:602-613.
- Prusiner SB. 1996. Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem Sci* 21:482-487.
- Prusiner SB. 1997. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278:245-251.
- Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. 1998a. Prion Protein Biology. *Cell* 93:337-348.
- Prusiner SB. 1998b. The prion diseases. *Brain Pathol* 8:499-513.

- Race R, Ernst D, Sutton D. 1994. Severe autolysis does not prevent scrapie diagnosis in sheep. *J Vet Diagn Invest* 6:486-489.
- Race R, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. 2001. Long-term subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaptation in a resistant species: analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J Virol* 75:10106-10112.
- Race R, Meade-White K, Raines A, Raymond GJ, Caughey B, Chesebro B. 2002. Subclinical scrapie infection in a resistant species: persistence, replication, and adaptation of infectivity during four passages. *J Infect Dis* 186:166-170.
- Raeber AJ, Brandner S, Klein MA, Benninger Y, Musahl C, Frigg R, Roeckl C, Fischer MB, Weissmann C, Aguzzi A. 1998. Transgenic and knockout mice in research on prion diseases. *Brain Pathol* 8:715-733.
- Reglamento CE 36/2005 de la Comisión, de 12 de enero de 2005, por el que se modifican los anexos III y X del Reglamento CE 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que se refiere a la vigilancia epidemiológica de las encefalopatías espongiformes transmisibles en animales bovinos, ovinos y caprinos.
- Richt JA, Kunkle RA, Alt D, Nicholson EM, Hamir AN, Czub S, Kluge J, Davis AJ, Hall SM. 2007. Identification and characterization of two bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in the United States. *J Vet Diagn Invest* 19:142-154.
- Riesner D, Kellings K, Post K, Wille H, Serban H, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB. 1996. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol* 70:1714-1722.
- Ritchie DL, Boyle A, McConnell I, Head MW, Ironside JW, Bruce ME. 2009. Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue show uniform and conserved bovine spongiform encephalopathy-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice. *J Gen Virol* 90:3075-3082.
- Roberts GW, Lofthouse R, Allsop D, Landon M, Kidd M, Prusiner SB, Crow TJ. 1988. CNS amyloid proteins in neurodegenerative diseases. *Neurology* 38:1534-1540.
- Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhratsky A. 2009. Astroglia in dementia and Alzheimer's disease. *Cell Death Differ* 16:378-385.
- Rubenstein R, Kascsak RJ, Merz PA, Papini MC, Carp RI, Robakis NK, Wisniewski HM. 1986. Detection of scrapie associated fibril (SAF) proteins using anti-SAF antibody in non-purified tissue preparations. *J Gen Virol* 67:671-681.
- Ryder SJ, Spencer YI, Bellerby PJ, March SA. 2001. Immunohistochemical

- detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec* 148:7-13.
- Saegerman C, Speybroeck N, Roels S, Vanopdenbosch E, Thiry E, Berkvens D. 2004. Decision support tools for clinical diagnosis of disease in cows with suspected bovine spongiform encephalopathy. *J Clin Microbiol* 42:172-178.
- Saegerman C, Berkvens D, Claes L, Dewaele A, Coignoul F, Ducatelle R, Cassart D, Brochier B, Costy F, Roels S, Deluyker H, Vanopdenbosch E, Thiry E. 2005. Population-level retrospective study of neurologically expressed disorders in ruminants before the onset of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in Belgium, a BSE risk III country. *J Clin Microbiol* 43:862-869.
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. 1998. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med* 4:1157-1165.
- Safar JG, Scott M, Monaghan J, Deering C, Didorenko S, Vergara J, Ball H, Legname G, Leclerc E, Solforosi L, Serban H, Groth D, Burton DR, Prusiner SB, Williamson RA. 2002. Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol* 20:1147-1150.
- Sailer A, Büeler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. 1994. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 77:967-968.
- Salguero FJ, Díaz-San SF, Brun A, Cano MJ, Torres JM. 2006. Comparison of three monoclonal antibodies for use in immunohistochemical detection of bovine spongiform encephalopathy protease-resistant prion protein. *J Vet Diagn Invest* 18:106-109.
- Sander P, Hamann H, Drögemüller C, Kashkevich K, Schiebel K, Leeb T. 2005. Bovine prion protein gene (PRNP) promoter polymorphisms modulate PRNP expression and may be responsible for differences in bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *J Biol Chem* 280:37408-37414.
- Sarasa R, Martínez A, Monleón E, Bolea R, Vargas A, Badiola JJ, Monzón M. The Involvement of Astrocytes in the Transmissible Spongiform Encephalopathies: A Confocal Microscopy Study. *Cell Tissue Res* (enviado para su publicación).
- Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandeveld M, Heim D, Oesch B, Moser M. 1999. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol* 98:437-443.
- Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. 1998. Tonsillar biopsy and PrP^{Sc} detection in the preclinical diagnosis of scrapie.

- Vet Rec 142:564-568.
- Scott AC, Done SH, Venables C, Dawson M. 1987. Detection of scrapie associated fibrils as an aid to the diagnosis of natural sheep scrapie. *Vet Rec* 120:280-281.
- Scott AC, Wells GA, Stack MJ, White H, Dawson M. 1990. Bovine spongiform encephalopathy: detection and quantitation of fibrils, fibril protein (PrP) and vacuolation in brain. *Vet Microbiol* 23:295-304.
- Scott AC, Wells GA, Chaplin MJ, Dawson M. 1992. Bovine spongiform encephalopathy: detection of fibrils in the central nervous system is not affected by autolysis. *Res Vet Sci* 52:332-336.
- Scott MR, Safar J, Telling G, Nguyen O, Groth D, Torchia M, Koehler R, Tremblay P, Walther D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1997. Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:14279-14284.
- Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. 1999. Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15137-15142.
- Scott MR, Supattapone S, Nguyen HO, DeArmond SJ, Prusiner SB. 2000. Transgenic models of prion disease. *Arch Virol Suppl*: 113-124.
- Scott MR, Peretz D, Nguyen HO, Dearmond SJ, Prusiner SB. 2005. Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol* 79:5259-5271.
- Shaked GM, Fridlander G, Meiner Z, Taraboulos A, Gabizon R. 1999. Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J Biol Chem* 274:17981-17986.
- Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IW, Wells GA. 1996. BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec* 138:175-177.
- Sisó S, Ordoñez M, Cerdán I, Vidal E, Pumarola M. 2004. Distribution of PrPres in the brains of BSE-affected cows detected by active surveillance in Catalonia, Spain. *Vet Rec* 155:524-525.
- Sisó S, Jeffrey M, González L. 2009. Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:232-246.
- Smith PG, Bradley R. 2003. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology. *Br Med Bull* 66:185-198.

- Somerville RA. 1985. Ultrastructural links between scrapie and Alzheimer's disease. *Lancet* 1:504-506.
- Somerville RA, Birkett CR, Farquhar CF, Hunter N, Goldmann W, Dornan J, Grover D, Hennion RM, Percy C, Foster J, Jeffrey M. 1997. Immunodetection of PrP^{Sc} in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *J Gen Virol* 78:2389-2396.
- Somerville RA. 1999. Host and transmissible spongiform encephalopathy agent strain control glycosylation of PrP. *J Gen Virol* 80:1865-1872.
- Stack MJ, Aldrich AM, Kitching AD, Scott AC. 1995. Comparative study of electron microscopical techniques for the detection of scrapie-associated fibrils. *Res Vet Sci* 59:247-254.
- Stack MJ, Keyes P, Scott AC. 1996. The diagnosis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie by the detection of fibrils and the abnormal protein isoform (págs 85-103). En: *Prion diseases*. Eds: Baker H, Ridley RM. Humana Press, Totowa, NJ.
- Stack M, Chaplin M, Clark J. 2002. Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol* 104:279-286.
- Stack M. 2004. Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies (págs 97-116). En: *Methods and tools in biosciences and medicine - Techniques in prion research*. Eds: Lehmann S, Grassi J. Birkhäuser Verlag, Berlin.
- Stack M, Focosi-Snyman R, Cawthraw S, Davis L, Jenkins R, Thorne L, Chaplin M, Everitt S, Saunders G, Terry L. 2009. Two unusual bovine spongiform encephalopathy cases detected in Great Britain. *Zoonoses and Public Health* 56:376-383.
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB. 1993. Structural studies of the scrapie prion using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32:1991-2002.
- Taraboulos A, Rogers M, Borchelt DR, McKinley MP, Scott M, Serban D, Prusiner SB. 1990. Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:8262-8266.
- Tateishi J, Nagara H, Hikita K, Sato Y. 1984. Amyloid plaques in the brains of mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 15:278-280.
- Taylor DM, Woodgate SL. 1997. Bovine spongiform encephalopathy: the causal role of ruminant-derived protein in cattle diets. *Rev Sci Tech* 16:187-198.

- Taylor DM. 2000. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: a review. *Vet J* 159:10-17.
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB. 1996. Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274:2079-2082.
- Thackray AM, Klein MA, Aguzzi A, Bujdoso R. 2002. Chronic subclinical prion disease induced by low dose inoculum. *J Virol* 76:2510-2517.
- Thuring CM, Erkens JH, Jacobs JG, Bossers A, Van Keulen LJ, Garsen GJ, Van Zijderveld FG, Ryder SJ, Groschup MH, Sweeney T, Langeveld JP. 2004. Discrimination between scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *J Clin Microbiol* 42:972-980.
- Thuring CM, van Keulen LJ, Langeveld JP, Vromans ME, van Zijderveld FG, Sweeney T. 2005. Immunohistochemical distinction between preclinical bovine spongiform encephalopathy and scrapie infection in sheep. *J Comp Pathol* 132:59-69.
- Tortosa R, Vidal E, Costa C, Alamillo E, Torres JM, Ferrer I, Pumarola M. 2008. Stress response in the central nervous system of a transgenic mouse model of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J* 178:126-129.
- Tsutsui T, Kasuga F. 2006. Assessment of the impact of cattle testing strategies on human exposure to BSE agents in Japan. *Int J Food Microbiol* 107:256-64.
- Unterberger U, Voigtlander T, Budka H. 2005. Pathogenesis of prion diseases. *Acta Neuropathologica (Berl)* 109:32-48.
- van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. 1995. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* 32:299-308.
- Velavos JL, Moleres FJ, Cuadrado MM, Irujo AM, Paternain B. 2006. Expresion y localizacion de la proteina prionica celular (PrPC) en el sistema nervioso central de la vaca. Algunas reflexiones sobre la nvCJD. *Neurologia* 21:421-427.
- Vidal E, Marquez M, Ordonez M, Raeber AJ, Struckmeyer T, Oesch B, Siso S, Pumarola M. 2005. Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE Weld cases using rapid tests. *J Virol Methods* 12:24-32.
- Vidal E, Marquez M, Tortosa R, Costa C, Serafin A, Pumarola M. 2006. Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages. *J Virol Methods* 13:15-29.
- Vilotte JL, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, Lepourry L, Da Silva

- JC, Besnard N, Dawson M, Buschmann A, Groschup M, Petit S, Madelaine MF, Rakatobe S, Le Dur A, Vilette D, Laude H. 2001. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine PrP. *J Virol* 75:5977-5984.
- Vorberg I, Priola SA. 2002. Molecular basis of scrapie strain glycoform variation. *J Biol Chem* 277:36775-36781.
- Vorberg I, Raines A, Story B, Priola SA. 2004. Susceptibility of common fibroblast cell lines to transmissible spongiform encephalopathy agents. *J Infect Dis* 189:431-439.
- Wear A, Henderson K, Webster K, Patel I. 2005. A comparison of rapid bovine spongiform encephalopathy testing methods on autolyzed bovine brain tissue. *J Vet Diagn Invest* 17:99-102.
- Weissmann C, Flechsig E. 2001. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* 66:43-60.
- Weissmann C, Enari M, Klöhn PC, Rossi D, Flechsig E. 2002. Transmission of prions. *J Infect Dis* 186:157-165.
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 121:419-420.
- Wells GAH, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS. 1989. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec* 125:521-524.
- Wells GAH, Wilesmith JW, McGill IS. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol* 1:69-78.
- Wells GAH, Hawkins SAC, Hadlow WJ, Spencer YI. 1992. The discovery of BSE and observations on the vacuolar changes (págs 256-274). En: *Prion diseases of human and animals*. Eds: Prusiner SB, Collinge J, Powell J, Anderton B. Ellis Horwood publishers, England.
- Wells GA, Dawson M, Hawkins SA, Green RB, Dexter I, Francis ME, Simmons MM, Austin AR, Horigan MW. 1994a. Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec* 135:40-41.
- Wells GA, Scott AC, Wilesmith JW, Simmons MM, Matthews D. 1994b. Correlation between the results of a histopathological examination and the detection of abnormal brain fibrils in the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Res Vet Sci* 56:346-351.
- Wells GA, Hawkins SA, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer I, Chaplin MJ, Stack MJ, Dawson M. 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE):

- an update. *Vet Rec* 142:103-106.
- Wells GA, Hawkins SA, Green RB, Spencer YI, Dexter I, Dawson M. 1999. Limited detection of sternal bone marrow infectivity in the clinical phase of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Rec* 144:292-294.
- Wells GA, Konold T, Arnold ME, Austin AR, Hawkins SA, Stack M, Simmons MM, Lee YH, Gavier-Widén D, Dawson M, Wilesmith JW. 2007. Bovine spongiform encephalopathy: the effect of oral exposure dose on attack rate and incubation period in cattle. *J Gen Virol* 88:1363-1373.
- Westaway D, Telling G, Priola S. 1998. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 11030-11031.
- Wilesmith JW, Wells GAH, Cranwell AH, Ryan JBM. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 123:638-644.
- Wilesmith JW, Ryan JBM, Hueston WD. 1992a. Bovine spongiform encephalopathy: case control studies of calf feeding practices y meat y bone meal inclusions in proprietary concentrates. *Res Vet Sci* 52:325-351.
- Wilesmith JW, Hoinville LJ, Ryan JB, Sayers AR. 1992b. Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986-1990. *Vet Rec* 130:197-201.
- Wiley CA, Burrola PG, Buchmeier MJ, Wooddell MK, Barry RA, Prusiner SB, Lampert PW. 1987. Immunogold localization of prion filaments in scrapie-infected hamster brains. *Lab Invest* 57:646-656.
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347:921-925.
- Will RG, Cousens SN, Farrington CP, Smith PG, Knight RS, Ironside JW. 1999. Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 353:979.
- Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB. 2002. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3563-3568.
- Williams ES, Young S. 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildlife Diseases* 16:89-98.
- Winter MH, Aldridge BM, Scott PR, Clarke M. 1989. Occurrence of 14 cases of bovine spongiform encephalopathy in a closed dairy herd. *Br Vet J* 145:191-194.
- Wood JLN, McGill IS, Done SH, Bradley R. 1997. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec* 140:167-174.

- Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T; Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. 2003. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn J Infect Dis* 56:221-222.
- Ye X, Scallet AC, Kascsak RJ, Carp RI. 1998. Astrocytosis and amyloid deposition in scrapie-infected hamsters. *Brain Res* 809:277-287.
- Yokoyama T. 1999. The immunodetection of the abnormal isoform of prion protein. *Histochem J* 31:209-212.
- Yokoyama T, Masujin K, Yamakawa Y, Sata T, Murayama Y, Shu Y, Okada H, Mohri S, Shinagawa M. 2007. Experimental transmission of two young and one suspended bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases to bovinized transgenic mice. *Jpn J Infect Dis* 60:317-320.
- Zlotnik I, Barlow RM. 1967. The transmission of a specific encephalopathy of mink to the goat. *Vet Rec* 81:55-56.

