TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
2024
356

María Belén Marín González

Aportaciones al estudio de la transmisibilidad y la infectividad del scrapie atípico

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

Director/es
Bolea Bailo, Rosa María
Badiola Díez, Juan José

ISSN 2254-7606

Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

APORTACIONES AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD Y LA INFECTIVIDAD DEL SCRAPIE ATÍPICO

Autor

María Belén Marín González

Director/es

Bolea Bailo, Rosa María
Badiola Díez, Juan José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

2024

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria

APORTACIONES AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD Y LA INFECTIVIDAD DEL SCRAPIE ATÍPICO

Memoria de tesis presentada por la licenciada

Mª Belén Marín González

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Directores

Rosa Mª Bolea Bailo

Juan José Badiola Díez

Zaragoza, marzo de 2024

Departamento de Patología Animal
Universidad Zaragoza

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. ROSA Mª BOLEA BAILO, Catedrática del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**, Director del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes y Profesor Honorario del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN

Que D. Mª Belén Marín González ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada "**APORTACIONES AL ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD Y LA INFECTIVIDAD DEL SCRAPIE ATÍPICO** " que se corresponde con el plan de investigación aprobado por la Comisión de Doctorado y cumple con los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

En Zaragoza, marzo de 2024.

Fdo: Rosa Mª Bolea Bailo

Fdo: Juan José Badiola Díez

Este trabajo ha sido posible gracias a la Universidad de Zaragoza, que ha aportado las instalaciones y a la cual pertenecen los Directores del trabajo y gracias al apoyo del siguiente programa y su proyecto:

- Programa de Cooperación Transfronteriza España, Francia y Andorra con contribución del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (POCTEFA-FEDER): Proyecto “Red de Investigación Transfronteriza en Enfermedades Priónicas Humanas y Animales”, EFA 148/16 (Redprion)

Abreviaturas		
s: Segundo	ml: Mililitro	µl: Microlitro
g: Gramo	nm: Nanómetro	µm: Micrómetro
µg: Microgramo	ºC: Grado centígrado	M: Molar
mM: Milimolar	h: Hora	m: Minuto

A	
ADN	Ácido desoxirribonucleico
api	*Años postinoculación*
B	
BCA	Ácido bicincochínico
BSA	*Bovine serum albumin*
BSE	*Bovine spongiform encephalopathy*
C	
C	Control
Cbl	Cerebelo
CDF	Células dendríticas foliculares
CITA	Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón
CReSA	Centre de Recerca en Sanitat Animal
C-EEB	Forma clásica de la Encefalopatía Espongiforme Bobina
CP	Corteza Parietal
CF	Corteza frontal
D	
DAB	*Diaminobenzidine*
dpc	Días post clínica
dpi	Días post inoculación
E	
ECC	Enfermedad crónica caquectizante
ECJ	Enfermedad Creutzfeldt-Jakob
EEB	Encefalopatía espongiforme bovina
EET	Encefalopatías espongiformes transmisibles
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
G	
GALT	*Gut- Associated Lymphoid Tissue*
H	
H-E	Hematoxilina y eosina
I	
IHQ	Inmunohistoquímica
K	
kDa	*Kilodalton*
M	
MAPA	Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación
MDNV	Núcleo motor dorsal del nervio vago
mpi	Años postinoculación
MES	Mesencéfalo
MEC	Médula Espinal Cervical

O	
OMSA	Organización Mundial de Sanidad Animal
ORF	Marco de lectura abierto
P	
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIRIBS	*Parallel In Register Intermolecular β-Sheet*
PK	Proteinasa K
PMCA	*Protein misfolding cyclic amplification*/Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas
PRNP	Gen que codifica la proteína prion
PrP	Proteína prion
PrP 27-30	PrP resistente a PK de 27-30 kDa
PrP^{C}	Proteína prion celular
PrP^{res}	PrP resistente a la digestión con proteasas
PrP^{Sc}	Proteína prion patológica
PVDF	Polifluoruro de Vinilideno
S	
SAF	Fibras asociadas a Scrapie
SDS	Dodecilsulfato sódico
SLR	Sistema linforreticular
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso periférico
T	
TBM	*Tingible Body Macrophages*
TGI	Tracto Gastrointestinal
TSE	*Transmissible spongiform encephalopathies*
U	
UE	Unión Europea
V	
vCJD	*Variant Creutzfeldt-Jakob disease*
vECJ	Variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob
W	
WB	*Western blot*

Aminoácidos

A: Alanina	C. Cisteína	D: Ác. aspártico
E: Ác. Glutámico	F: Fenilalanina	G: Glicina
H: Histidina	I: Isoleucina	K: Lisina
L: Leucina	M: Metionina	N: Asparagina
P: Prolina	Q: Glutamina	R: Arginina
S: Serina	T: Treonina	V: Valina
W: Triptófano	Y: Tirosina	

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ..... - 1 -
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA ..... - 5 -
2.1 LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES ..... - 6 -
2.1.1. Encefalopatía Espongiforme Bovina ..... - 7 -
2.1.2. Scrapie ..... - 8 -
2.1.3. Scrapie atípico ..... - 8 -
2.2. ETIOLOGÍA ..... - 9 -
2.2.1. Proteína prion celular (PrP^{C}) y proteína prion patológica (PrP^{Sc}) ..... - 10 -
2.3. FACTORES GENÉTICOS ..... - 13 -
2.3.1. Factores genéticos y scrapie atípico ..... - 16 -
2.4. PATOGENIA ..... - 18 -
2.4.1. Patogenia y scrapie atípico ..... - 22 -
2.5. CUADRO CLÍNICO ..... - 23 -
2.5.1. Cuadro clínico y scrapie atípico ..... - 24 -
2.6. TRANSMISIÓN ..... - 25 -
2.6.1. Transmisión y scrapie atípico ..... - 27 -
2.6.2. Transmisión interespecie ..... - 28 -
2.7 EPIDEMIOLOGÍA ..... - 29 -
2.7.1. Epidemiología y scrapie atípico ..... - 31 -
2.8. DIAGNÓSTICO ..... - 33 -
2.8.1. Diagnóstico antemorten ..... - 34 -
2.8.2. Diagnóstico postmorten ..... - 34 -
2.8.3. Diagnóstico del scrapie atípico ..... - 36 -
3. ESTUDIO Nº 1. ANÁLISIS DE LA PATOGENIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA PRION PATOLÓGICA ASOCIADA AL SCRAPIE ATÍPICO EN LA ESPECIE OVINA EN ANIMALES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE VÍA INTRACEREBRAL. ..... - 38 -
3.1. INTRODUCCIÓN ..... - 39 -
3.2. OBJETIVOS ..... - 40 -
3.3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 40 -
3.3.1. Selección de animales y procedimiento experimental ..... - 40 -
3.3.2. Vigilancia y valoración clínica ..... - 42 -

3.3.3. Recogida de muestras y tejidos de los animales ..... - 42 -
3.3.4. Estudio inmunohistoquímico ..... - 43 -
3.3.5. Detección de la PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA ..... - 45 -
3.4. RESULTADOS ..... - 46 -
3.4.1. Evolución clínica de los animales ..... - 46 -
3.4.2. Patrón de distribución de la proteína prion ..... - 49 -
3.4.3. Resultados de la técnica ELISA de diagnóstico rápido para scrapie ..... - 52 -
3.5. DISCUSIÓN ..... - 53 -
4. ESTUDIO Nº 2. ESTUDIO DE LA INFECTIVIDAD DE LAS PLACENTAS PROCEDENTES DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE VÍA INTRACEREBRAL CON EL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO. ..... - 56 -
4.1. INTRODUCCIÓN ..... - 57 -
4.2. OBJETIVOS ..... - 57 -
4.3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 58 -
4.3.1. Partos y recogida de placentas ..... - 58 -
4.3.2. Estudio de las placentas mediante técnicas rápidas e IHQ ..... - 58 -
4.3.3. Bioensayo de las placentas en modelo murino ..... - 59 -
4.3.4. Mantenimiento de los ratones inoculados ..... - 60 -
4.3.5. Detección de PrP^{Sc} mediante Pet Blot en los ratones inoculados ..... - 60 -
4.3.6. Detección de PrP^{Sc} mediante Western Blot en los ratones inoculados ..... - 61 -
4.3.7. Amplificación de PrP^{Sc} en el encéfalo de los ratones mediante PMCA ..... - 61 -
4.4. RESULTADOS ..... - 62 -
4.4.1. Resultados del análisis por técnicas rápidas e IHQ de las placentas ..... - 62 -
4.4.2. Resultados del bioensayo ..... - 63 -
4.5. DISCUSIÓN ..... - 66 -
5. ESTUDIO Nº 3. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DEL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO POR INFECCIÓN EXPERIMENTAL VÍA ORAL A LA ESPECIE OVINA. ..... - 69 -
5.1. INTRODUCCIÓN ..... - 70 -
5.2. OBJETIVOS ..... - 72 -
5.3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 72 -
5.3.1. Selección de animales y procedimiento experimental ..... - 72 -
5.3.2. Vigilancia y valoración clínica de los animales. ..... - 73 -
5.3.3. Recogida de muestras y tejidos de los animales ..... - 74 -
5.3.4. Estudio inmunohistoquímico de las muestras ..... - 75 -
5.3.5. Detección de la PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA ..... - 76 -

5.3.6. Amplificación de PrP^{Sc} en el encéfalo de las ovejas mediante PMCA ..... - 76 -
5.4. RESULTADOS ..... - 77 -
5.4.1. Resultados de la vigilancia y valoración clínica de los animales ..... - 77 -
5.4.2. Resultados de la búsqueda de PrP^{Sc} mediante ELISA e IHQ ..... - 78 -
5.4.3. Resultados de la amplificación de PrP^{Sc} mediante PMCA ..... - 78 -
5.5. DISCUSIÓN ..... - 80 -
6. ESTUDIO Nº 4. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DEL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO A LA ESPECIE PORCINA. ..... - 84 -
6.1. INTRODUCCIÓN ..... - 85 -
6.2. OBJETIVOS ..... - 87 -
6.3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 87 -
6.3.1. Selección de animales ..... - 87 -
6.3.2. Inóculos utilizados ..... - 88 -
6.3.3. Procedimiento experimental con los animales ..... - 88 -
6.3.4. Vigilancia y valoración clínica ..... - 89 -
6.3.5. Recogida de muestras y tejidos de los animales ..... - 89 -
6.3.6. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico ..... - 90 -
6.3.7. Detección de PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA ..... - 90 -
6.3.8. Detección de PrP^{Sc} mediante Western Blot ..... - 90 -
6.3.9. Bioensayo en ratón ..... - 91 -
6.3.10 Amplificación PMCA ..... - 91 -
6.4. RESULTADOS ..... - 92 -
6.4.1. Valoración clínica ..... - 92 -
6.4.2. Métodos clásicos de detección de la PrP^{Sc} ..... - 93 -
6.4.3. Bioensayo en ratones transgénicos que expresan la PrP^{C} porcina (TgPo) ..... - 95 -
6.4.4. Resultados PMCA ..... - 95 -
6.5. DISCUSIÓN ..... - 98 -
7. ESTUDIO Nº 5. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DEL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO A LA ESPECIE BOVINA. ..... - 102 -
7.1. INTRODUCCIÓN ..... - 103 -
7.2. OBJETIVOS ..... - 104 -
7.3. MATERIAL Y MÉTODOS ..... - 104 -
7.3.1. Selección de animales ..... - 104 -
7.3.2. Inóculo utilizado ..... - 104 -

7.3.3. Procedimiento experimental con los animales ..... - 105 -
7.3.4. Vigilancia y valoración clínica ..... - 105 -
7.3.5. Recogida de muestras y tejidos de los animales ..... - 106 -
7.3.6. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico ..... - 106 -
7.3.7. Detección de PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA ..... - 107 -
7.3.8. Detección de PrP^{Sc} mediante WESTERN BLOT ..... - 107 -
7.3.9 amplificación de PrP^{Sc} mediante PMCA ..... - 107 -
7.4. RESULTADOS ..... - 108 -
7.4.1. Valoración clínica ..... - 108 -
7.4.2. Métodos clásicos de detección de la PrP^{Sc} ..... - 109 -
7.4.3. Resultados PMCA ..... - 110 -
7.5. DISCUSIÓN ..... - 112 -
8. DISCUSIÓN GENERAL ..... - 115 -
9. CONCLUSIONES ..... - 125 -
10. RESUMEN/ABSTRACT ..... - 128 -
9.1. RESUMEN ..... - 129 -
9.2. ABSTRACT ..... - 131 -
ANEXOS ..... - 133 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... - 143 -

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura secundaria de la PrP^{Sc}. A) Modelo PIRIBS (*parallel in-register intermolecular beta-sheet*), en el cual cada monómero de PrPSc es un piso de la fibra amiloidea y B) Modelo de β-solenoide de cuatro escalones (*4-rung β-solenoid*), en el cual cada monómero de PrP^{Sc} forma cuatro pisos de la fibra de amiloide. Adaptación de (Groveman et al., 2014; Spagnolli et al., 2019)……12

Figura 2. Evolución del número de focos de scrapie/año……..31

Figura 3. Áreas del SNC valoradas mediante la técnica de IHQ……..44

Figura 4. Signos clínicos por animal y fecha de aparición……..47

Figura 5: Imágenes de distintas áreas del SNC ovino, dónde se pueden observar mediante la técnica de IHQ los distintos tipos de depósito que aparecen en el Scrapie atípico; a) Depósito en placa y puntiforme a nivel del tálamo (núcleos talámicos) (40x); b) Depósito de tipo coalescente y punteado grueso a nivel de núcleos basales (40x); c) Depósito de tipo puntiforme a nivel de la capa granular del cerebelo (40x); d) Imagen de capa molecular de cerebelo con gran depósito de PrP^{Sc}, de tipo puntiforme (10x)……51

Figura 6: Imágenes de distintas áreas del SNP ovino, dónde se pueden observar depósito de PrP^{Sc} mediante la técnica de IHQ con el anticuerpo 8G8; a) bulbo olfatorio, b) nervio óptico……52

Figura 7: Imagen de retina de una oveja inoculada con scrapie atípico por vía intracerebral tras la técnica de IHQ con el anticuerpo 8G8 e imagen de Hortells y colaboradores de 2006, de retina de oveja afectada por scrapie clásico tras la técnica de IHQ con el anticuerpo L42……52

Figura 8. A. Foto de placenta en postparto, detección negativa de PrP^{Sc} por técnica IHQ (Ac 8G8), 20x. B Depósitos de pigmento ceroide y hemosiderina 20x en placenta……63

Figura 9. Resultados de la técnica de Petblot de los ratones Tg 338 inoculados por vía intracerebral con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observa que todos los animales son negativos, excepto los controles positivos que corresponden con el cerebelo de una oveja infectada con scrapie atípico y el encéfalo de un ratón Tg 338 inoculado con un aislado de scrapie atípico……64

Figura 10. Resultados de la técnica de Western Blot de 16 ratones Tg338 inoculados por vía intracerebral con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observa que todos los animales son negativos, excepto el control positivo en el que se observan las bandas características del scrapie atípico y que se trata de un ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico……64

Figura 11. Resultados de Dot Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de los ratones inoculados con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observa inmunodetección en todos de los homogenizados de encéfalo de los ratones inoculados con las 6 placentas, así como en todas las diluciones de los dos controles. C+ 1 es la cepa Dawson, de scrapie clásico en ratón y C+ 2 es encéfalo de ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico. En el sustrato sin muestra utilizado como control negativo no se observa inmunodetección……65

Figura 12. Resultados de Western Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de los ratones inoculados con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observan en

todas las muestras las bandas de glicosilación características de scrapie clásico, así como en los dos controles, la cepa Dawson de scrapie clásico en ratón y encéfalo de ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico……..66

Figura 13. Técnica Dot Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de las ovejas inoculadas vía oral con scrapie atípico. Solo se observa inmunodetección en dos de los tres homogenizados de encéfalo de la oveja O-02 con sustrato TgBov. Ese mismo animal utilizando sustrato Tg ARQ, así como el resto de ovejas inoculadas con scrapie atípico por vía oral arrojan resultado negativo. El C- 1, control negativo utilizando solo sustrato de TgARQ sin muestra y el C- 2, control negativo, utilizando sustrato TgBov sin muestra, no muestran amplificación. En la técnica se utilizaros 5 controles positivos, todos diluidos desde la dilución 10^{-1} a la 10^{-8}. C+ 1, homogeneizado de scrapie clásico en sustrato Tg ARQ. C+ 2, homogeneizado de scrapie atípico en sustrato Tg ARQ. C+ 3, homogeneizado de scrapie clásico en sustrato TgBov. C+ 4, homogeneizado de scrapie atípico en sustrato TgBov. C+ 5, homogeneizado de EEB en sustrato TgBov. Solo se detecta inmunodetección en el C+ 5, hasta la dilución 10^{-6}……79

Figura 14. Resultados de Western Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de las ovejas inoculadas por vía oral con scrapie atípico. Se observan en todas las dos muestras de la oveja O-02 las bandas de glicosilación características de EEB, así como en el control de EEB, la cepa Dawson de scrapie clásico en ratón muestra las bandas de glicosilación características de scrapie clásico……80

Figura 15. Imagen de la inoculación intracerebral con scrapie atípico en uno de los cerdos utilizados en el estudio……..89

Figura 16. PrP^{res} detectada en reacciones de PMCA sembradas con encéfalo (corteza parietal) de los cerdos inoculados con scrapie atípico. Las reacciones positivas de PMCA muestran un patrón de glicoforma idéntico al de los priones de EEB clásica de bovinos y/o EEB clásica de bovinos propagados en el sustrato de tgBov (tercera línea). Se obtuvieron reacciones positivas de cerdos inoculados con los dos aislados originales de scrapie atípico (aislado PS152: P-1215 y P-1216; aislado TOA3: P-1228). Las reacciones de PMCA sembradas con homogeneizado de encéfalo de una oveja negativa a cualquier EET y las reacciones de PMCA no sembradas se incluyen como controles de la técnica. Las reacciones de PMCA se sometieron a 3 rondas de amplificación (15 s de sonicación, 14 min de 50 s de incubación a 39 ° C) en un sonicador Qsonica700 y se analizaron para PrP^{res} por Western Blot utilizando los anticuerpos monoclonales anti-PrP Sha31 y 12B2. Control de WB = aislado de scrapie clásico……96

Figura 17. Resultados negativos de la técnica de diagnóstico Western Blot utilizando el anticuerpo Sha31 de cuatro áreas del encéfalo de las cuatro vacas inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico. Corteza frontal (Fc), tálamo (Th), cerebelo (Cbl) y óbex. Como control positivo se incluye encéfalo de una oveja infectada con scrapie clásico y de una vaca infectada con EEB……109

Figura 18. A. Resultados de la técnica de diagnóstico Western Blot utilizando el anticuerpo Sha31 y 12B2 de los productos de reacción PMCA de corteza frontal (Fc), tálamo (Th) y cerebelo (Cbl) de las cuatro vacas inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico y una vaca control negativo. Como controles positivos se utilizaron un aislado de un encéfalo de una vaca con EEB clásica y un aislado de una oveja infectada con scrapie clásico. B. Las cantidades relativas de glicoformas diglicosiladas (barra negra), monoglicosiladas (barra gris) y no glicosiladas (barra blanca) de los productos PMCA sembrados con muestras del encéfalo de bovinos inoculados con scrapie atípico y seis controles de C-EEB se determinaron mediante el software Image J. Los resultados

se presentan como media ± desviación estándar. No se observaron diferencias significativas en la cantidad relativa de glicoformas de PrP^{Sc} entre las muestras del estudio y los controles de C-EEB……111

Figura 19. Resultados de la técnica de diagnóstico Western Blot, utilizando el anticuerpo Sha31, de los productos de reacción PMCA del inóculo de scrapie atípico PS152. Como control positivo se incluyen los productos de PMCA de una vaca con EEB clásica y una oveja con scrapie clásico propagadas en sustrato TgBov, un aislado de EEB clásica y un aislado de scrapie clásico……112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Encefalopatías espongiformes transmisibles en humano……6

Tabla 2. Encefalopatías espongiformes transmisibles en animales……..6

Tabla 3. Polimorfismos que suponen cambio aminoacídico descritos en el gen *PRNP* ovino……14

Tabla 4. Alelos de *PRNP* relacionados con la susceptibilidad a scrapie ovino con alta frecuencia……14

Tabla 5. Clasificación de grupos de riesgo según el genotipo *PRNP*……..15

Tabla 6. Recopilación de genotipos de 241 casos de scrapie atípico obtenidos de 4 países……..17

Tabla 7. Número de animales analizados y de focos diagnosticados por año……..30

Tabla 8. Número de animales diagnosticados con cada una de las dos variantes de scrapie……32

Tabla 9. Relación de ovejas inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico……41

Tabla 10. Relación de animales inoculados vía intracerebral con scrapie atípico con la fecha de eutanasia……..43

Tabla 11. Días de intervalo entre inoculación, inicio de síntomas y eutanasia de todas las ovejas inoculadas intracerebralmente con scrapie atípico……48

Tabla 12: Relación de placentas recogidas para bioensayo……58

Tabla 13. Resultados del estudio de los ratones inoculados con las placentas de ovejas con scrapie atípico……63

Tabla 14. Relación de ovejas inoculadas vía oral con scrapie atípico……..72

Tabla 15. Relación de animales inoculados por vía oral con scrapie atípico con fecha de eutanasia. dpi (días postinoculación), api (años postinoculación)……74

Tabla 16. Relación de cerdos inoculados por vía intracerebral con dos aislados de scrapie atípico……92

Tabla 17. Resultados de la técnica de ELISA de distintas áreas del encéfalo de los cerdos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico……94

Tabla 18. Resultados bioensayo de los ratones TgPo inoculados con un homogeneizado de encéfalo al 10% de cada uno de los cerdos inoculados con scrapie atípico……..95

Tabla 19. Resultados PMCA de muestras de diferentes áreas encefálicas de los cerdos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico utilizando cerebros de ratones tgBov como sustrato..97

Tabla 20. Relación de bovinos inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico……105

Tabla 21. Relación de bovinos inoculados intracerebralmente con scrapie atípico, causa y fecha de la eutanasia……109

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades priónicas o Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan al ser humano y a diversas especies animales. Tienen largo periodo de incubación y un curso invariablemente fatal.

El agente causal, comúnmente denominado prion, es un agente no convencional de naturaleza exclusivamente proteica y carente de ácidos nucleicos. El prion deriva de un cambio conformacional de la proteína celular normal (PrP^{C}), que por razones aún desconocidas cambia una parte de su estructura secundaria de α-hélice a láminas β plegada. Esta proteína modificada se conoce como proteína prion patológica (PrP^{Sc}). La PrP^{Sc} tiene capacidad para inducir la transformación de la PrP^{C} en PrP^{Sc} que tiende a formar agregados, sobre todo a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) (Prusiner, 1998).

La principal característica neuropatológica de estas enfermedades es la degeneración espongiforme del SNC, con aparición de vacuolas tanto en las neuronas, como en el neuropilo, produciéndose además una pérdida neuronal. Estas lesiones dan lugar a manifestaciones clínicas de tipo neurológico en el individuo que las padece entre los que se incluyen alteraciones en el comportamiento y déficits locomotores (Fraser, 1993).

Los priones pueden transmitirse a otros individuos e incluso a otras especies, sin embargo, esta capacidad de transmisión entre especies está condicionada por la llamada barrera de transmisión.

Según su origen las EET se pueden clasificar en esporádicas, hereditarias o infecciosas. Dentro de este grupo de enfermedades, la más conocida y representativa es el scrapie, que afecta a los pequeños rumiantes. Fue la primera que se describió en el año 1732 y es, además, la enfermedad prototipo dentro de este grupo.

El scrapie se presenta de dos formas: la clásica y la atípica. La forma clásica se considera una enfermedad infecciosa, mientras que la forma atípica se considera de origen no infeccioso y probablemente de aparición espontánea. El scrapie atípico se identificó por primera vez en Noruega en 1998, motivo por el cual se le conoce también como Nor98 (Benestad et al., 2003) y posteriormente se ha ido describiendo en muchos otros países.

Algunas de las diferencias entre las dos formas de scrapie, además del origen ya mencionado son las diferentes características clínicas, patológicas e inmunoquímicas de cada una de ellas. Además, la transmisión en ambas enfermedades está influenciada pon el genotipo del gen *PRNP*, apareciendo el scrapie atípico con mayor frecuencia en animales de genotipos clasificados de menor riesgo para el scrapie clásico y favorecidos por los programas de selección genética para la erradicación de esta variante (Saunders et al., 2006).

En el scrapie clásico el depósito de la PrP^{Sc} se produce en primer lugar y de forma mayoritaria en el tronco del encéfalo, mientras que en la forma atípica este depósito afecta principalmente al cerebelo, ocasionando como signo clínico más importante y constante la ataxia. En el scrapie atípico, a diferencia de lo que ocurre en el clásico, no se detecta la PrP^{Sc} fuera del encéfalo con los métodos de diagnóstico clásicos, sin embargo, sí se ha detectado infectividad, mediante

bioensayos en ratones, en algunos tejidos periféricos, a pesar de esa aparente ausencia de depósitos de PrP^{Sc} (Andreoletti et al., 2011; Simmons et al., 2011). Esto indica que las pruebas diagnósticas realizadas en los métodos de vigilancia actuales podrían no detectar algunos de estos animales y que podría pasar a la cadena alimentaria material potencialmente infeccioso sin ser detectado.

Aunque no hay evidencias epidemiológicas de que el scrapie atípico se transmita de forma natural a nivel de campo, el hecho de que la enfermedad se haya podido transmitir de forma experimental mediante inoculación oral (Simmons et al., 2011), nos lleva a pensar que esa transmisión podría ser potencialmente posible. Además, trabajos con ratones transgénicos han demostrado la susceptibilidad potencial de los cerdos, junto con el preocupante hallazgo de que las propiedades bioquímicas de la PrP^{Sc} resultante han cambiado tras esta transmisión (Espinosa et al., 2009).

Estudios más recientes han demostrado que el scrapie atípico podría ser el origen de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) clásica (Huor et al., 2019), haciendo que aumente la relevancia biológica esta enfermedad.

Aunque actualmente no hay evidencias sobre el potencial zoonótico del scrapie atípico, estas nuevas líneas de investigación demuestran que la transmisión entre especies puede hacer que las propiedades patológicas y biológicas del agente cambien, haciendo que la proteína prion del scrapie atípico ovino, que en principio no es transmisible, al entrar en contacto con proteína prion bovina se convierta en un agente zoonótico, y esto implique que la exposición de ganado bovino a la cepa atípica de scrapie produzca la emergencia de nuevos casos de EEB.

Por estos motivos el objetivo principal de esta tesis es profundizar en el estudio de la transmisibilidad y la infectividad del scrapie atípico y está organizada en cinco estudios cuyos objetivos se detallan a continuación.

ESTUDIO Nº1. Análisis de la patogenia y distribución de la proteína prion patológica asociada al scrapie atípico en la especie ovina en animales infectados experimentalmente vía intracerebral.

Objetivo general: Estudiar del comportamiento de un aislado priónico de scrapie atípico en ovinos de distintos genotipos, con el fin de estudiar la diseminación de la proteína priónica y comparar el comportamiento de dicho aislado en función del genotipo, así como de la edad del animal en el momento de la infección experimental.

ESTUDIO Nº2. Estudio de la infectividad de las placentas procedentes de ovinos infectados experimentalmente vía intracerebral con el agente del scrapie atípico.

Objetivo general: Estudiar la infectividad de los tejidos más críticos en el caso del scrapie clásico, como son las placentas, para valorar su importancia como transmisoras de esta enfermedad.

ESTUDIO Nº3. Estudio de la transmisibilidad del agente del scrapie atípico por infección experimental vía oral a la especie ovina.

Objetivo general: Estudiar la infectividad y el comportamiento de un aislado priónico de scrapie atípico, administrado por vía oral en ovinos de distintos genotipos, con el fin de estudiar la posibilidad de que se produjera una infección en animales expuestos a dicho agente en condiciones naturales de granja.

ESTUDIO Nº4. Estudio de la transmisibilidad del agente del scrapie atípico a la especie porcina.

Objetivo general: Determinar la transmisibilidad del agente del scrapie atípico a la especie porcina, su distribución por el organismo y la infectividad de los tejidos afectados en los animales.

ESTUDIO Nº5. Estudio de la transmisibilidad del agente del scrapie atípico a la especie bovina.

Objetivo general: Determinar la transmisibilidad del agente del scrapie atípico a la especie bovina, su distribución por el organismo y la infectividad de los tejidos afectados en los animales.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, también llamadas enfermedades priónicas, son un grupo de enfermedades degenerativas del SNC que afectan al ser humano y a diversas especies animales (Tablas 1 y 2). Se caracterizan por presentar periodos de incubación largos y un curso lento e insidioso, que irreversiblemente termina con la muerte del individuo. Estas enfermedades deben su nombre a la degeneración de tipo espongiforme que producen en el SNC acompañada de pérdida neuronal y reacción de las células de la glía. Esto se produce en ausencia de reacción inflamatoria clásica y de respuesta humoral asociada.

Según su origen las EET se pueden clasificar en esporádicas (cuando no se conoce una causa aparente), hereditarias (cuando su presentación se debe a una mutación en el gen *PRNP*) o infecciosas (cuando se debe a un contacto con el agente causal).

Las EET que se conocen en el ser humano son las siguientes:

Tabla 1. Encefalopatías espongiformes transmisibles en humano.

ENFERMEDAD	ORIGEN	DESCRIPCIÓN
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica	Esporádica	1920
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar	Hereditaria	1924
Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Hereditaria	1936
Kuru	Infecciosa	1953
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica	Infecciosa	1974
Insomnio Familiar Fatal	Hereditaria	1986
Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)	Infecciosa	1996
Insomnio esporádico fatal	Esporádica	1999
Prionopatía variable sensible a la proteasa	Esporádica	2008

Las encefalopatías espongiformes descritas en distintas especies animales hasta el momento, todas ellas de carácter infeccioso, son las siguientes:

Tabla 2. Encefalopatías espongiformes transmisibles en animales

ESPECIE	ENFERMEDAD	DESCRIPCIÓN
Ovinos y caprinos	Scrapie	1732
Visón	Encefalopatía transmisible del visón	1947
Cérvidos	Enfermedad crónica caquectizante (ECC)	1967
Bovino	Encefalopatía espongiforme bovina (EEB)	1986
Felinos	Encefalopatía espongiforme felina	1990
Antílope	Encefalopatía de ungulados exóticos	1985
Lémur	EET de los primates no humanos	1996
Dromedario	Enfermedad priónica de los camélidos	2018

En otras especies animales como la porcina, equina, cunícula y canina, no se ha diagnosticado nunca un caso natural de estas enfermedades, por lo que se pueden considerar resistentes en

condiciones naturales, sin embargo, sí que se ha demostrado su susceptibilidad a la infección experimental en determinadas ocasiones (Hedman et al., 2016).

Hasta la fecha el único agente causal conocido de las EET es el prion o PrP^{Sc} (Prusiner, 1998), un agente no convencional, que carece de material genético y se deposita en el SNC y otros tejidos. El prion deriva de un cambio conformacional de la proteína celular normal (PrP^{C}), que por razones aún desconocidas cambia una parte de su estructura secundaria de α-hélice a láminas β plegada. La PrP^{Sc} tiene capacidad para inducir la transformación de la PrP^{C} en PrP^{Sc} que tiende a formar agregados, sobre todo a nivel el SNC.

La conformación de los priones les hace ser muy resistentes a los métodos de inactivación de los agentes infecciosos convencionales, tanto físicos (resisten altas temperaturas y la luz ultravioleta) como químicos (resistencia al tratamiento con formaldehido).

Los priones pueden transmitirse a otros individuos e incluso a otras especies, sin embargo, esta capacidad de transmisión entre especies está condicionada por la llamada barrera de transmisión, la cual está controlada por la secuencia del gen que codifica la PrP^{C} del hospedador, por la secuencia del gen de la especie de la que procede el prion infectivo y por la ruta de entrada de la PrP^{Sc} al organismo.

Existen variaciones estructurales de la proteína prion que se denominas cepas y que se distinguen entre sí mediante estudios de transmisión en ratones, analizando el periodo de incubación que inducen, sus características clínicas, el patrón lesional que ocasionan y el perfil de acumulación de la PrP^{Sc}. Hasta el momento solo en la enfermedad de scrapie se han identificado más de veinte cepas de priones (Hirogari et al., 2003).

2.1.1. Encefalopatía Espongiforme Bovina

La EEB, es la EET que más relevancia ha tenido, debido a la gran repercusión sanitaria, política y económica que tuvo tras la descripción de los primeros casos en 1986 (Wells et al., 1987). Estudios epidemiológicos confirmaron que la causa de la EEB fue el consumo de harinas de carne y hueso contaminadas con el agente causal (Wilesmith et al., 1988) y, aunque existen otras teorías, la más aceptada es que el ganado bovino británico fue expuesto a una contaminación con el agente del scrapie ovino por vía alimentaria.

Cuando en 1996, se identificó una nueva enfermedad humana denominada variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Will & Zeidler, 1996), sus características clínicas, neuropatológicas, bioquímicas y epidemiológicas hicieron sospechar que era consecuencia de la transmisión del agente de la EEB al ser humano (Hill et al., 1997). Esta relación contribuyó en gran medida a su estudio y añadió gran relevancia a estas enfermedades.

La capacidad de la EEB para saltar la barrera de especie, y en especial su potencial zoonótico, hacen de esta enfermedad un riesgo para la salud pública habiéndose establecido un conjunto de medidas para mejorar su detección y para erradicarla. Las medidas adoptadas por la Comisión Europea de vigilancia y control de la EEB han logrado el control de la enfermedad en un tiempo

relativamente corto. Sin embargo, no se puede afirmar que se haya erradicado porque siguen detectándose casos en algunos países de la Unión Europea, lo que unido al diagnóstico de la presencia de EEB en dos cabras (Eloit et al., 2005; Jeffrey et al., 2006; Spiropoulos et al., 2011), hacen necesario continuar con la investigación y la vigilancia de estas enfermedades como hasta ahora.

Las pruebas bioquímicas que permiten discriminar entre la EEB experimental ovina y el scrapie no han revelado ningún indicio de que existan ovejas naturalmente infectadas por EEB (Sharpe et al., 2005).

2.1.2. Scrapie

El scrapie ovino es la primera de estas enfermedades que se conoce. Se describió por primera vez en 1732 en Reino Unido y está ampliamente distribuida por todo el mundo (Detwiler & Baylis, 2003). Recibe también otros nombres que hacen referencia a algunos de sus signos clínicos más habituales, conociéndose también como tembladera, debido a los temblores que padecen muchos de los animales afectados y como prurigo lumbar, por el prurito intenso y continuado que también padecen la mayoría de los individuos afectados en algún momento del curso de la enfermedad.

También fue la primera de estas enfermedades que se consiguió transmitir de forma experimental confirmándose así su carácter infeccioso. Desde entonces el scrapie sigue siendo el modelo más utilizado en el estudio de este grupo de enfermedades.

En 1936, Cuille y Chele consiguieron reproducir la enfermedad en ovejas y cabras mediante la inoculación intraocular de un macerado de médula espinal procedente de animales infectados, siendo desde entonces la más estudiada y considerándose como la enfermedad prototipo de este grupo de patologías (Cuillé & Chelle, 1936).

Tras su primera descripción en Reino Unido en 1732, se hicieron descripciones en Alemania en 1750 y en Francia en 1788, mientras que en otros países europeos como los escandinavos, Holanda, Bélgica y España la enfermedad se describió por primera vez a mediados del siglo XX. En países pertenecientes a otros continentes como India, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos, Sudáfrica y Kenia, se describen casos de scrapie a principios y mediados del siglo XX, por importación de animales procedentes de países en los que existía la enfermedad como Francia y Reino Unido (Detwiler & Baylis, 2003). Hay muchos países en los cuales no se conoce el estatus sanitario de esta enfermedad al no existir programas de vigilancia para ello. Únicamente Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica parecen estar actualmente libres de esta enfermedad (Cosseddu et al., 2007).

2.1.3. Scrapie atípico

En 1998, se identificó en Noruega una nueva EET ovina denominada scrapie atípico o Nor98, y posteriormente se han ido describiendo casos en otros países europeos. Al igual que en otros países, en los últimos años está aumentando la incidencia del scrapie atípico en España

(MAPAMA), siendo actualmente mayor el número de focos detectados de este tipo en comparación con los de scrapie clásico.

Las principales diferencias entre el scrapie clásico y el atípico están relacionadas con el perfil lesional y el genotipo animal; no obstante, las características clínicas, patológicas e inmunoquímicas también difieren en gran medida de la enfermedad clásica de scrapie. En el scrapie atípico, los depósitos de PrP^{Sc} y las lesiones se encuentran principalmente en el cerebelo y no en el óbex como ocurre con el clásico; además, la PrP^{Sc} no se detecta en tejidos periféricos (Gavier-Widén et al., 2005) aunque se ha observado infectividad en sistema linforeticular (SLR), nervios y músculos (Andreoletti et al., 2011).

Aunque el scrapie se considera generalmente una enfermedad infecciosa, el patrón observado ha llevado a la especulación de que el scrapie Nor98 es una enfermedad esporádica análoga a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádico en los seres humanos. La fuerte asociación con ciertos alelos y la elevada edad de los animales enfermos estaría de acuerdo con esta hipótesis (Moum et al., 2005).

Aunque el scrapie atípico ha sido objeto de menos estudios que la variante clásica, a medida que se desarrollan nuevas investigaciones, crece la relevancia biológica esta enfermedad. Hay estudios que la relacionan con el origen del scrapie clásico (Simmons et al., 2015), e incluso un estudio más reciente con el origen de la EEB clásica (Huor et al., 2019).

2.2. ETIOLOGÍA

Desde los primeros casos de EET descritos, las especiales características del agente causal de esas enfermedades han supuesto una gran controversia a la hora de definir su naturaleza.

Primero se pensó que se trataba de un lentivirus debido al largo periodo de incubación que proporcionaba y a que el material procedente de animales enfermos conservaba su infectividad tras su filtración mediante filtros especiales para virus (Wilson et al., 1950).

Una serie de experimentos, publicados en 1967, confirmaron que el agente parecía ser resistente tanto a las radiaciones ultravioletas, como a las ionizantes, propiedades que lo hacían incompatible con la presencia de ácidos nucleicos. Esto llevo a pensar en la naturaleza no vírica del agente y a la posibilidad de que se tratara de un polisacárido replicante (Alper et al., 1967).

También en 1967, Griffith formuló por primera vez la hipótesis que daría pie a la única propuesta aceptada en la actualidad, el agente causal del scrapie es una proteína auto-replicante (Griffith, 1967).

En 1982, Stanley B. Prusiner se basó en la teoría de Griffith para postular que el agente causal es una partícula infecciosa de naturaleza proteica, capaz de autoreplicarse y carente de ácidos nucleicos, a la que denominó prion (protein infectious only) (Prusiner, 1982). Esta proteína prion patológica (PrP^{Sc}) es una isoforma anormal de la glicoproteína de membrana citoplasmática codificada por el hospedador (PrP^{C}). Este postulado era contrario a la teoría admitida de forma

generalizada de que todo agente infeccioso necesita de la presencia de material genético y esto unido a otras incógnitas como el hecho de que existieran diferentes cepas de priones, dio lugar a la aparición de dos nuevas teorías.

La teoría del virino afirma que el agente causal es una molécula quimérica, constituida por una proteína codificada por el hospedador y un ácido nucleico no codificante, propio del agente infeccioso (Dickinson & Outram, 1988). En este caso el ácido nucleico contendría la información genética necesaria para imprimir la conformación anormal de la proteína propia del hospedador, la cual a su vez le serviría de protección frente a tratamientos que normalmente romperían dicho ácido (Lasmézas, 2003).

La segunda teoría, mantenida durante varios años, asegura que el agente causal es ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial envuelto por una proteína que protegería el ácido nucleico y favorecería su propagación (Aiken et al., 1989; Manuelidis, 2007).

No obstante, la mayoría de los experimentos llevados a cabo desde entonces aportan numerosas evidencias que apoyan la hipótesis del prion, siendo la única aceptada en la actualidad, no habiéndose identificado ningún ácido nucleico específico y siendo la proteína prion el único componente conocido del agente causal y el único marcador molecular asociado a las EET (Prusiner, 1998).

En 1999 se demostró que si se incubaban moléculas de PrP^{C} marcadas radioactivamente con PrP^{Sc} no marcada, se generaban moléculas de PrP^{Sc} radiactivas (Caughey et al., 1999), y poco después se creó la técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (PMCA), una técnica que consiste en la amplificación de la PrP^{Sc} mediante ciclos de sonicación seguidos de incubaciones con homogeneizado de cerebro sano (Saá et al., 2006; Saborio et al., 2001), lo cual permitió demostrar que la amplificación de la PrP^{Sc} supone un aumento de la infectividad (Castilla et al., 2005).

2.2.1. Proteína prion celular (PrP^{C}) y proteína prion patológica (PrP^{Sc})

La PrP^{C} es una glicoproteína de un peso molecular de 33-35 kDa que se encuentra unida a la membrana celular mediante la fracción glicofosfatidilinositol (Criado et al., 2005; Martins & Brentani, 2002). Está codificada por el gen *PRNP* y consta de aproximadamente 250 aminoácidos, dependiendo de la especie animal. Presenta dos sitios de N-glicosilación en los residuos Asn 181 y Asn 197, los cuales dan lugar a tres glicoformas: la forma aglicosilada, la monoglicosilada y la diglicosilada (Caughey et al., 1989; Monari et al., 1994).

La presencia de PrP^{C} en las células es necesaria para el desarrollo de las enfermedades priónicas, estando su nivel de expresión directamente relacionado con el periodo de incubación y la progresión de la enfermedad (Brandner et al., 1996; Bueler et al., 1993; Prusiner et al., 1993).

La PrP^{C} está implicada en la neuroprotección, la transducción de señales, la supresión de la apoptosis, el desarrollo neuronal, la formación de la memoria a largo plazo, la creación de células

madre hematopoyéticas de auto-renovación, la adhesión celular y el metabolismo del cobre (Martins et al., 2001).

La proteína PrP^C se expresa a inicios de la embriogénesis y en los individuos adultos está presente en altos niveles en las neuronas del encéfalo y de la médula espinal y en bajos niveles en las células de la glía del sistema nervioso central (Harris et al., 1993). La PrP^C también presenta altos niveles de expresión en el SLR, especialmente en linfocitos y células dendríticas foliculares (Aguzzi & Heikenwalder, 2006).

En los ovinos se ha descrito una amplia distribución de la PrP^C por diversos órganos y tejidos. Varios estudios, establecieron que el órgano con una mayor cantidad de PrP^C era el encéfalo, detectándose de 20 a 50 veces más cantidad que en resto de tejidos analizados, seguido del pulmón, músculo esquelético, corazón, útero, timo, lengua, páncreas, bazo y amígdalas (Moudjou et al., 2001).

Parece que el contenido de la proteína PrP^C en estos tejidos es similar para los diferentes individuos, sin embargo, en otros tejidos como el tracto gastrointestinal, donde los niveles de PrP^C son bajos, sí que se detectan diferencias entre un animal y otro.

También se ha detectado PrP^C en diferentes zonas del aparato reproductivo de la oveja como el miometrio, endometrio, oviducto, ovario, líquido alantoideo y placenta (Evoniuk et al., 2008). Durante la gestación ovina parece que la expresión de la PrP^C en la placenta está regulada en el epitelio caruncular (Tuo et al., 2001).

Además de los tejidos anteriores también se ha detectado PrP^C en el hígado y riñón, aunque en niveles muy bajos, en las glándulas mamaria y adrenal (Horiuchi et al., 1995) y en las glándulas salivares (Herrmann et al., 2000).

La PrP^{Sc} está codificada por el mismo gen (Basler et al., 1986), y está constituida por la misma secuencia de aminoácidos que la PrP^C (Stahl et al., 1993) y ambas tienen el mismo peso molecular. Sin embargo, presenta distintas características físicas y químicas respecto a la PrP^C, como una movilidad electroforética y un perfil de la glicoforma distintos y una resistencia parcial a las proteinasas (González et al., 2003).

La transformación de PrP^C a PrP^{Sc} consiste en un cambio conformacional y se realiza por un mecanismo de post-traslación (Borchelt et al., 1990; Caughey & Raymond, 1991). La PrP^C tiene un contenido del 42% de α hélice y solo el 3% de hoja β, y en un principio se pensaba que, tras el proceso de conversión, la región C-terminal conservaba la conformación de hélice α y la mayor parte de los cambios estructurales se producían en la región N-terminal de la proteína, que adoptaba una conformación de lámina β, dando lugar a que la PrP^{Sc} presentara un 30% de α hélice y un 43% de hojas plegada β (Pan et al., 1993; Prusiner, 1996).

Actualmente existen dos modelos que parecen a aproximarse más a la estructura real de la PrP^{Sc} y ambos sostienen que está compuesta únicamente por lámina β, y que no existen en ella hélices de tipo α. Estos modelos proponen distintas disposiciones para las láminas β dentro de cada

monómero de la PrP^{Sc} y diferente posición de cada uno de estos monómeros en las fibras de amiloide. Uno de estos modelos es el β-solenoide de cuatro escalones (*4-rung β-solenoid*), el cual describe la estructura de la proteína a través del uso de criomicroscopía electrónica (Vázquez-Fernández et al., 2016), y el otro es el modelo PIRIBS (*parallel in-register intermolecular beta-sheet*), que se basa en el estudio de PrP^{Sc} recombinante mediante resonancia magnética nuclear (Groveman et al., 2014). Pese a que, estos modelos se basan en predicciones teóricas, otros estudios recientes han respaldado la propuesta del modelo PIRIBS mediante evidencia empírica al mostrar fotografías de algunas cepas de PrP^{Sc} realizadas mediante criomicroscopía electrónica (Hoyt et al., 2022; Kraus et al., 2021; Manka et al., 2022).

Estudios comparativos de ambas proteínas han demostrado que esta modificación estructural va acompañado de cambios en las propiedades fisicoquímicas y biológicas de la proteína: la PrP^{C} es soluble en detergentes suaves no desnaturalizantes y se digiere fácilmente con proteasas (proteinasa K), la isoforma patológica es insoluble en detergentes no iónicos y resistente a la mayor parte de agentes químicos, el calor y las radiaciones ionizantes y ultravioletas (Caughey & Chesebro, 2001; Prusiner, 1998). Además, solo se digiere parcialmente por proteasas, obteniéndose un producto de escisión proteolítica terminal denominado PrP^{res} o $PrP^{27\text{-}30}$ que retiene la infectividad y puede utilizarse para el diagnóstico de la enfermedad y la caracterización de cepas priónicas (Bolton et al., 1982; Gielbert et al., 2009).

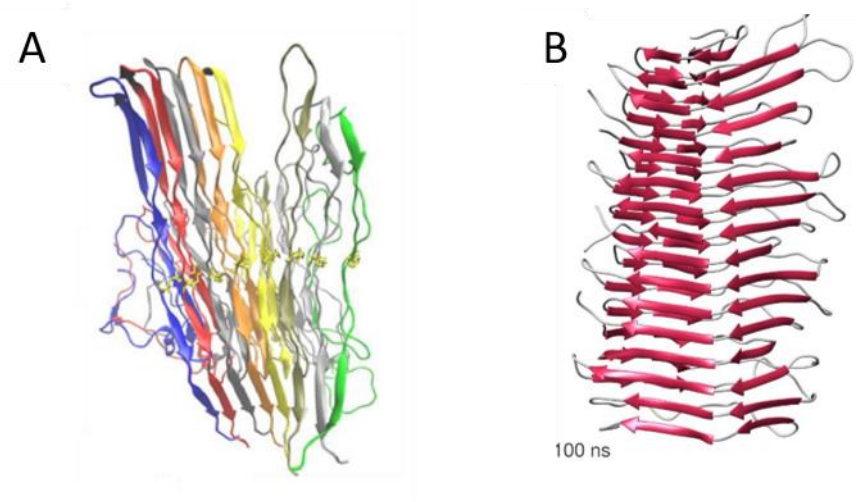


Figura 1. Estructura secundaria de la PrP^{Sc}. A) Modelo PIRIBS (*parallel in-register intermolecular beta-sheet*), en el cual cada monómero de PrPSc es un piso de la fibra amiloidea y B) Modelo de β-solenoide de cuatro escalones (*4-rung β-solenoid*), en el cual cada monómero de PrP^{Sc} forma cuatro pisos de la fibra de amiloide. Adaptación de (Groveman et al., 2014; Spagnolli et al., 2019).

2.3. FACTORES GENÉTICOS

En la susceptibilidad o resistencia de las ovejas al scrapie se ha demostrado una gran influencia del genotipo del gen *PRNP*. Este gen, que codifica la proteína prion, se encuentra en el cromosoma 13 en los rumiantes y tiene una longitud variable, según la especie. Está formado por dos o tres exones, pero toda la región codificante (ORF) se encuentra en un único exón. En el caso de la especie ovina el gen *PRNP* posee 31.412 pares de bases y está formado por tres exones, localizándose el ORF en el exón tres.

Este gen codifica una glicoproteína de membrana, la PrP^C, que posee entre 230 y 256 aminoácidos y su secuencia está altamente conservada entre las distintas especies llegando hasta un 94% de secuencia nucleotídica idéntica entre las especies bovina y ovina. En el caso del gen *PRNP* humano, éste presenta una homología del 65,4% con el ovino y del 66,7% en el bovino.

Las variantes alélicas del gen *PRNP* afectan tanto al periodo de incubación como a la susceptibilidad a las enfermedades priónicas en la especie humana y en especies animales (Carlson et al., 1986; Hunter et al., 1994).

En el scrapie ovino se conoce muy bien la gran influencia de la genética del hospedador en el desarrollo de la enfermedad, habiéndose establecido relaciones entre ciertos polimorfismos del gen *PRNP* y la incidencia del scrapie. Estos conocimientos se están aplicando en la actualidad en el control de esta enfermedad en las especies ovina y caprina.

Este gen presenta un alto grado de variabilidad, describiéndose en los ovinos al menos 41 mutaciones que suponen un cambio aminoacídico en 27 codones distintos (Goldmann, 2008) (Tabla 3). Algunos de los polimorfismos descritos en el gen *PRNP* ovino están claramente asociados al período de incubación y a la susceptibilidad de los ovinos a la enfermedad de scrapie (Chesebro, 1999; Hunter, 1997; Hunter et al., 1989). Los polimorfismos más importantes y frecuentes son los producidos en los codones 136, 154 y 171. El codón 136 codifica para valina (V), alanina (A) o treonina (T), el codón 154 codifica para arginina (R) o histidina (H) y el codón 171 codifica para glutamina (Q), lisina (K), histidina (H) o arginina (R). Estos tres codones polimórficos tienen un efecto muy importante en el grado de susceptibilidad o resistencia del ovino al scrapie, influyendo en la incidencia y en la edad de inicio de la enfermedad en muchas razas ovinas (Hunter et al., 1997; Tongue et al., 2004).

Del conjunto total de los posibles alelos (3x2x3), sólo cinco han demostrado una clara asociación con la susceptibilidad o resistencia al scrapie clásico ovino (Tabla 4) (Goldmann et al., 1994; Hamir et al., 2005; Sharpe et al., 2006).

El alelo ancestral es del gen *PRNP*, el ARQ (correspondiente a la posición alanina en el codón 136, arginina en el 154 y glutamina en el 171), habiéndose originado el resto de alelos mediante mutaciones puntuales del citado. La frecuencia y distribución de las distintas combinaciones varía según la raza. La presencia de arginina en la posición 171 parece conferir resistencia, mientras que los aminoácidos valina en la posición 136 y glutamina en la posición 171 están asociados a la susceptibilidad; esto hace que la variante VRQ sea la más sensible y la ARR la más

resistente al scrapie clásico. Este último haplotipo parece tener un efecto dominante ya que los animales heterocigotos con alelos susceptibles presentan un menor riesgo de padecer la enfermedad (Clouscard et al., 1995; Goldmann et al., 1994; Westaway et al., 1994).

Tabla 3. Polimorfismos que suponen cambio aminoacídico descritos en el gen *PRNP* ovino.

Codón	Mutación	Referencia	Codón	Mutación	Referencia
85	G → R	(Lan et al., 2006)	**152**	Y → F	(Zhang et al., 2004)
101	Q → R	(Acin et al., 2004)	**154**	R → H	(Goldmann et al., 1991)
112	M → T	(Laplanche et al., 1993)	**154**	R → L	(Alvarez et al., 2006)
112	M → I	(Zhang et al., 2004)	**167**	R → S	(DeSilva et al., 2003)
116	A → P	(Seabury & Derr, 2003)	**168**	P → L	(Goldmann et al., 2006)
127	G → A	(Heaton et al., 2003)	**171**	Q → H	(Belt et al., 1995)
127	G → V	(Gombojav et al., 2004)	**171**	Q → K	(DeSilva et al., 2003)
127	G → S	(Gombojav et al., 2004; Zhang et al., 2004)	**171**	Q → R	(Goldmann et al., 1990)
136	A → V	(Goldmann et al., 1991)	**172**	Y → D	(Acin et al., 2004)
136	A → T	(Billinis et al., 2004)	**175**	Q → E	(Acin et al., 2004)
137	M → T	(Bossers et al., 1996)	**176**	N → K	(Vaccari et al., 2001)
138	S → N	(Thorgeirsdottir et al., 1999; Tranulis et al., 1999)	**180**	H → Y	(Acutis et al., 2004; Heaton et al., 2003)
138	S → R	(DeSilva et al., 2003)	**189**	Q → L	(Gombojav et al., 2004; Zhang et al., 2004)
141	L → F	(Bossers et al., 1996)	**189**	Q → R	(Gombojav et al., 2004)
142	I → K	(Vaccari et al., 2007)	**195**	T → S	(DeSilva et al., 2003)
143	H → R	(DeSilva et al., 2003; Heaton et al., 2003)	**196**	T → S	(DeSilva et al., 2003)
146	N → S	(Zhang et al., 2004)	**211**	R → Q	(Belt et al., 1995)
151	R → C	(Thorgeirsdottir et al., 1999; Tranulis et al., 1999)	**241**	P → S	(Heaton et al., 2003)
151	R → G	(Acin et al., 2004)			

Tabla 4. Alelos de *PRNP* relacionados con la susceptibilidad a scrapie ovino con alta frecuencia.

Haplotipos	136	154	171
PrP^{ARR}	Ala (A)	Arg (R)	Arg (R)
PrP^{AHQ}	Ala (A)	His (H)	Gln (Q)
PrP^{ARH}	Ala (A)	Arg (R)	His (H)
PrP^{ARQ}	Ala (A)	Arg (R)	Gln (Q)
PrP^{VRQ}	Val (V)	Arg (R)	Gln (Q)

Combinando los 5 haplotipos más frecuentes (ARQ, ARR, VRQ, AHQ, ARH), y de los cuales se ha demostrado una clara asociación con la susceptibilidad o resistencia frente a scrapie (Goldmann et al., 1994; Hamir et al., 2005; Sharpe et al., 2006); se clasificaron los genotipos resultantes

basados en el riesgo a padecer la enfermedad, dando como resultado cinco grupos que incluyen 15 genotipos diferentes y fueron valorados de R1 a R5 (Dawson et al., 2008), (Tabla 5). Esta tabla fue la propuesta como guía para la selección genética de los animales, utilizada como el procedimiento de erradicación de la enfermedad, cuyo objetivo fue favorecer la selección de los genotipos resistentes.

Tabla 5. Clasificación de grupos de riesgo según el genotipo *PRNP*.

Genotipo	Grupo	Definición
ARR/ARR	R1	Riesgo muy bajo de desarrollar la enfermedad, así como de que la desarrolle su progenie de primera generación.
ARR/AHQ **ARR/ARH** **ARR/ARQ**	R2	Riesgo bajo del individuo y de la progenie.
AHQ/AHQ **AHQ/ARH** **AHQ/ARQ** **ARH/ARH** **ARH/ARQ** **ARQ/ARQ**	R3	Riesgo bajo del individuo, pero el de la progenie puede aumentar dependiendo del genotipo del otro parental.
ARR/VRQ	R4	La enfermedad puede desarrollarse de forma ocasional y la progenie tiene mayor riesgo que la del grupo anterior.
AHQ/VRQ **ARH/VRQ** **ARQ/VRQ** **VRQ/VRQ**	R5	Riesgo más alto de padecer scrapie.

En lo que respecta al resto de haplotipos posibles (AHR, VRR, ARK, TQR Y VHQ) se han identificado con baja frecuencia y su asociación con el scrapie es desconocida (Acin et al., 2004; Alvarez et al., 2006; Billinis et al., 2004; DeSilva et al., 2003; Goldmann et al., 2006; Lan et al., 2006). El haplotipo ARK ha sido descrito únicamente en dos animales positivos a scrapie (Acutis et al., 2006), lo que sugiere que la presencia de lisina en el codón 171 no confiere resistencia a la enfermedad.

En España, como en el resto de los países de la Unión Europea (UE), se aplica desde 2002 un programa de selección genética como herramienta de erradicación del scrapie, que se basa en aumentar la proporción de los animales resistentes en el conjunto de la población ovina (riesgo 1-2; Tabla 5) en detrimento de los animales susceptibles.

Se debe tener en cuenta que una selección intensa de un determinado haplotipo puede aumentar la consanguinidad de la población, especialmente en razas en las que los genotipos resistentes tienen baja frecuencia y puede causar una reducción de la variabilidad genética (Acutis et al., 2004; Drögemüller et al., 2001). Algunos autores han sugerido que esta selección podría provocar una disminución de caracteres productivos, debido a una asociación entre el gen *PRNP* y algún gen responsable de rendimientos productivos (Brandsma et al., 2005). Sin embargo, otros estudios han puesto de manifiesto que no existe una asociación entre el

genotipo del gen *PRNP* y determinados caracteres productivos de los animales como la producción de carne y leche (De Vries et al., 2005; Tichopad et al., 2004).

También se debe reseñar, que esta clasificación se basa en probabilidades, no en certezas, ya que, independientemente del riesgo existente, para que un animal padezca la enfermedad, siempre es necesario que se produzca un contacto con el agente causal. También se ha puesto de manifiesto que la presencia de los genotipos resistentes (ARR/ARR) puede suponer un riesgo epidemiológico porque puede originar animales asintomáticos. En diferentes estudios se ha demostrado la infección experimental con EEB por vía intracerebral y oral en ovejas homocigotas ARR (Andréoletti et al., 2006; Houston & Gravenor, 2003). Si la inoculación se realiza por vía periférica, la ausencia de signos clínicos hasta 6 años después de la exposición experimental, sugiere que los portadores asintomáticos del agente de la EEB puedan existir entre las ovejas ARR homocigóticas. Igualmente, el perfil electroforético de la PrP^{Sc} no glicosilada en estos animales es similar al descrito en animales afectados de scrapie natural (Ronzon et al., 2006).

2.3.1. Factores genéticos y scrapie atípico

A pesar de la resistencia conferida por ciertos haplotipos, se han descrito casos de scrapie en animales con los siguientes genotipos ARR/ARR, ARR/ARQ y AHQ/AHQ (Benestad et al., 2003; Buschmann, Lühken, et al., 2004; Groschup et al., 2007; Orge et al., 2004) clasificados como de bajo y muy bajo riesgo (R1-R3; Tabla 5). Algunos de estos casos están asociados con la cepa de scrapie Nor 98 causante del scrapie atípico (Benestad et al., 2003).

Todavía hay muchas preguntas sin resolver sobre la asociación entre el gen *PRNP* y la susceptibilidad de los animales al scrapie atípico. No obstante, estudios realizados hasta la actualidad evidencian que el scrapie atípico afecta a animales con genotipos del gen *PRNP* diferentes a los del scrapie clásico (Saunders et al., 2006).

Una de las primeras descripciones del gen *PRNP* en el scrapie atípico (Moum et al., 2005), realizada mediante el genotipado de 4 codones: 136, 141, 154 y 171, reveló varios datos importantes:

- El polimorfismo leucina/fenilalanina en el codón 141, cuyo significado hasta ahora desconocido para el scrapie clásico, está altamente asociado a los casos descritos de scrapie atípico. El 52,6% de los animales afectados por scrapie atípico eran homocigotos o heterocigotos para la fenilalanina en el codón 141. En contraste, este alelo estaba presente en sólo el 10,5% de rebaños no afectados y en un 4,5 % de los animales sacrificados.

- El alelo H154 estuvo presente en el 63,2% de los casos de scrapie atípico, en oposición al 27% de rebaños no afectados y el 17% de las ovejas sacrificadas.

- El haplotipo VRQ, que confiere susceptibilidad al scrapie clásico, estaba completamente ausente en los casos de scrapie atípico descritos en Noruega, aunque estaba presente en animales sanos del rebaño.

- Existen estudios adicionales realizados en Alemania (Lühken et al., 2007), Francia (Arsac et al., 2007) y Reino Unido (Saunders et al., 2006) y todos ellos apuntan a la misma conclusión, que este tipo de scrapie está fuertemente asociado a polimorfismos en los codones 141 y 154 del gen *PRNP*. Es importante destacar que describen la existencia de portadores de scrapie atípico con genotipo ARR/ARR (Saunders et al., 2006).

- La edad media de inicio de los signos clínicos en animales afectados fue de 6 años, pero no hay ninguna asociación significativa entre la edad y el genotipo. Podría, sin embargo, ser posible que esta edad media, que es más alta que en los animales afectados por scrapie clásico, pueda ser debida a la presencia de genotipos inusuales involucrados. No obstante, esta hipótesis se ve debilitada por la observación de que los animales que tienen el genotipo ARQ/ARQ, que son susceptibles tanto para scrapie clásico como atípico, son también mayores cuando están afectados por el scrapie atípico que cuando lo están por scrapie clásico.

Por lo tanto, a pesar de todo lo descrito, queda mucho por conocer acerca de la susceptibilidad genética a esta enfermedad. Por ejemplo, un aspecto aún sin explicar pero que llama la atención es el por qué el genotipo VRQ/AHQ presenta un bajo riesgo en ambos tipos de scrapie, a pesar de que se compone de los dos alelos con mayor riesgo de susceptibilidad para el scrapie clásico (Baylis et al., 2004) y atípico (Saunders et al., 2006), respectivamente.

Tabla 6. Recopilación de genotipos de 241 casos de scrapie atípico obtenidos de 4 países (Moum et al., 2005).

Genotipo (136/141/154/171)	(observaciones *n* = 241)	Frecuencia (%)
ALRQ / ALHQ	34	14.1
ALHQ / ALRR	32	13.3
AFRQ / ALRR	31	12.9
ALHQ / ALHQ	29	12.0
AFRQ / AFRQ	23	9.5
AFRQ / ALRQ	23	9.5
AFRQ / ALHQ	21	8.7
ALRR / ALRR	21	8.7
ALRQ / ALRQ	8	3.3
ALRQ / ALRR	8	3.3
AFRQ / VLRQ	5	2.1
ALHQ / ALRH	3	1.3
ALHQ / VLRQ	1	0.4
ALRH / ALRR	1	0.4
ALRH / ALRH	1	0.4
AFRQ / ALRH	0	0
ALRQ / ALRH	0	0
ALRQ / VLRQ	0	0
ALRH / VLRQ	0	0
ALRR / VLRQ	0	0
VLRQ / VLRQ	0	0

Así, podríamos decir que el scrapie atípico se presenta generalmente en los grupos de riesgo R1-R3, seleccionados como más resistentes para el scrapie clásico (Goldmann, 2008), por lo que la selección genética para la resistencia al scrapie clásico podría aumentar la susceptibilidad de la población ovina al scrapie atípico. Esto ha provocado que se ponga en entredicho el uso del genotipado como la mejor forma de erradicar el scrapie (Baylis & McIntyre, 2004). A pesar de estos inconvenientes que plantea la selección de genotipos, a nivel europeo se continúa con el plan de genotipado de scrapie adoptado por la UE en la Decisión CE Nº1003/2002, pero introduciendo una nueva clasificación más ajustada a la realidad en base a los continuos estudios realizados acerca de la susceptibilidad genética frente a scrapie.

2.4. PATOGENIA

Se han descrito varias encefalopatías espongiformes transmisibles cuyo origen se asocia a la ingestión por vía oral de material contaminado con el agente causal. Entre ellas podemos incluir el scrapie en ovejas y cabras, la EEB en bovinos, la ECC de los cérvidos, o la vECJ en los seres humanos (Beekes & McBride, 2007).

Se han realizado numerosos estudios sobre la patogenia del scrapie, utilizando modelos murinos y en menor medida ovinos infectados de forma natural o experimental. Aunque los modelos murinos han permitido aclarar aspectos fundamentales de la patogenia (Aguzzi, 2001; Weissmann et al., 2001), podrían no reflejar fielmente la diseminación del agente en el hospedador natural porque se hubiera producido una adaptación de las cepas priónicas al modelo experimental.

En la infección natural, la entrada del prion al organismo comienza con la ingestión del material infeccioso que posteriormente es conducido al SNC (Shmakov & Ghosh, 2001). Se ha observado que existen dos rutas principales de neuroinvasión, una vía directa a través del sistema nervioso periférico (SNP) y otra que implica una participación previa del SLR, antes de su paso al SNP (Race et al., 2000).

La neuroinvasión comienza a través del tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT: del inglés, Gut-Associated Lymphoid Tissue), principalmente el constituido por las placas de Peyer ileal y yeyunal y el de los linfonodos mesentéricos; aunque también puede ocurrir a través de las amígdalas, propagándose después al resto del GALT y a otros tejidos del SLR como el bazo (Andreoletti et al., 2000; van Keulen et al., 2000). Las placas de Peyer están formadas por tejido linfoide primario que involuciona con la edad, lo que explicaría la mayor susceptibilidad a contraer la enfermedad en edades tempranas (St Rose et al., 2006).

El prion se incorpora al organismo mediante un mecanismo de translocación, en el cual desempeñan un papel importante las células M, que son enterocitos modificados que se localizan adyacentes a las placas de Peyer en el epitelio de recubrimiento intestinal. Estas células M son capaces de captar proteínas, pero sin degradarlas posteriormente, de manera que son presentadas como antígenos al SLR. De esta forma, la PrP^{Sc} es incorporada al tejido linfoide

subepitelial (Mabbott & Bruce, 2001), alcanzando los folículos linfoides secundarios donde se acumula y se replica tanto en los macrófagos de cuerpo tingible (TBM: en inglés, Tingible Body Macrophages) como en las células dendríticas foliculares (CDF) (Heggebo et al., 2002; Jeffrey, Martin, et al., 2001; Lezmi et al., 2001; van Keulen et al., 1996), siendo estas últimas las principales responsables en el desarrollo inicial de la enfermedad (Beekes & McBride, 2000; Jeffrey et al., 2000). Esta etapa inicial de invasión del tejido linfoide suele coincidir con la fase preclínica de la enfermedad.

A partir de los lugares iniciales de la replicación del agente se puede observar una difusión a otros tejidos linfoides no relacionados con GALT, tales como el tejido linfoide asociado a la membrana nictitante (Vargas et al., 2006), a los linfonodos retrofaríngeos y a la mucosa rectal (Monleón et al., 2011; Monleón et al., 2005). La importancia y la duración de la participación del SLR y de otros órganos en la patogenia del scrapie depende de diversos factores como la dosis del agente infeccioso, el lugar de inoculación, la cepa del prion, el genotipo y raza del hospedador (Jeffrey & González, 2007; van Keulen et al., 2008).

Uno de los factores que más influye en la patogenia de la enfermedad es el genotipo del gen *PRNP* del hospedador. En el caso de los animales con genotipo ARR/VRQ infectados de scrapie, el SLR está implicado de forma mínima o incluso nula en la replicación del agente (van Keulen et al., 1996). Sin embargo, los animales de genotipo VRQ/VRQ se caracterizan por una rápida y masiva acumulación de PrP^{Sc} en el tejido linfoide mientras que los animales con el genotipo ancestral ARQ/ARQ acumulan PrP^{Sc} en el SLR más lentamente (Andreoletti et al., 2000; van Keulen et al., 2002).

Una vez que la PrP^{Sc} se ha acumulado y replicado en el GALT a nivel de íleon, la neuroinvasión se iniciaría en el sistema nervioso entérico (SNE) atravesando la barrera intestinal. No se conoce con exactitud el mecanismo por el cual el agente causal pasa del SLR al nervioso, pero algunos estudios parecen indicar que se produce desde las CDF hasta las fibras nerviosas que inervan los folículos linfoides, siendo mayor la velocidad de neuroinvasión cuanto menor es la distancia topográfica entre estas terminaciones nerviosas y las CDF (Heggebø et al., 2003; Prinz et al., 2003). A partir de ahí la diseminación del agente se puede producir pasivamente por drenaje linfático desde las CDF degeneradas que lo liberan hasta las terminaciones nerviosas o puede ser transportado por células móviles como los macrófagos o las células dendríticas (Aguzzi, 2001; Andreoletti et al., 2000).

Inicialmente, se pueden observar depósitos de PrP^{Sc} en los ganglios nerviosos de los plexos a nivel del íleon, posteriormente estos depósitos se van propagando de forma ascendente y descendente a lo largo de todo el SNE presentando un patrón de diseminación similar al del SLR (Heggebo et al., 2002; van Keulen et al., 2002).

Se han propuesto dos rutas principales para explicar la llegada de la PrP^{Sc} desde al SNE al SNC (Beekes et al., 1998; Race et al., 2000; van Keulen et al., 2002):

- A través de la médula espinal torácica (columna intermedio lateral, segmentos T5-L1) mediante el nervio esplácnico y los ganglios mesentéricos craneal y celiaco.
- A través de la médula oblongada, en el núcleo motor dorsal del nervio vago, mediante fibras nerviosas parasimpáticas eferentes.

Una vez alcanzado el SNC, el prion se disemina de forma ascendente y descendente a través de él (Kimberlin & Walker, 1980) acumulándose en el resto del encéfalo y de la médula espinal y produciendo astrogliosis, vacuolización del tejido nervioso y neurodegeneración, dando así lugar a la sintomatología nerviosa característica de la enfermedad. Además, también puede diseminarse de forma centrífuga por el SNP, alcanzando diversos tejidos y órganos periféricos como por ejemplo el músculo periférico, donde se ha detectado tanto en ovejas afectadas por scrapie como en personas infectadas con la vECJ (Andréoletti et al., 2004; Peden et al., 2006).

Aunque estas dos rutas de neuroinvasión del prion (a través del SNP y del SLR) sean consideradas las principales, no se puede descartar la participación de otras posibles rutas de diseminación de forma independiente o paralela, como podría ser el caso de la vía hematógena (Siso et al., 2010). Se han publicado trabajos que describen la transmisión del scrapie mediante transfusiones sanguíneas lo que pondría de manifiesto la infectividad de la sangre de animales infectados (Houston et al., 2008; Hunter et al., 2002). En el caso del ovino, la transmisión se ha podido realizar tanto con sangre completa como con la inoculación de únicamente la fracción leucocitaria de animales que se encontraban en la fase final del scrapie clínico (Hunter et al., 2002). La presencia de PrP^{Sc} en sangre se ha podido detectar en ovejas infectadas tanto con scrapie como con EEB (Terry et al., 2009; Thorne & Terry, 2008), e incluso en personas afectadas de vECJ en fase preclínica (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004; Wroe et al., 2006). Recientemente, se ha demostrado que, independientemente de la vía de inoculación, se produce una acumulación permanente y temprana de PrP^{Sc} en los órganos circunventriculares, estructuras localizadas en las paredes del tercer y cuarto ventrículo que carecen de barrera hematoencefálica, lo que sugiere que podría tratarse de una puerta de entrada al SNC por vía hematógena (Siso et al., 2009). Además, se han descrito casos naturales de ovejas que presentaban acumulación de PrP^{Sc} en el encéfalo pero en ausencia de depósito en el SNE (Jeffrey et al., 2002).

Otra vía de diseminación descrita ha sido la linfática, ya que se ha detectado PrP^{Sc} en los senos subcapsulares de los ganglios linfáticos (Ersdal et al., 2005).

Diferentes estudios han demostrado una distribución periférica del scrapie (aquella diferente del SNC y del SLR), mediante el estudio de la infectividad o de la acumulación de PrP^{Sc} en diferentes órganos, algunos de los cuales se describen a continuación:

- Nervios periféricos: presencia de depósito en los nervios isquiático, mediano, tibial, fibular, axilar y ulnar en el caso de la oveja (Groschup et al., 1996). En el caso del ganado caprino se ha observado depósito de la proteína prion en los nervios ciático y braquial (Lacroux et al., 2014).

- Glándula adrenal: Se ha observado presencia en la zona medular en el caso de los ovinos (Garza et al., 2014; Jeffrey, Martin, et al., 2001) y en la zona medular y región fascicular del córtex en los caprinos (Acín et al., 2013).

- Músculo esquelético: se trata de un órgano de gran relevancia debido a su extendida utilización en la alimentación humana. Por este motivo ha sido objeto de numerosos estudios. Se ha detectado presencia de PrP^{Sc} en músculo de extremidades de ratones inoculados intracerebralmente con scrapie (Bosque et al., 2002), también en diversos músculos de hámster inoculados oralmente con scrapie (Thomzig et al., 2003; Thomzig et al., 2004). En el hospedador natural, el ovino, se ha detectado acumulación de PrP^{Sc} en miocitos de los músculos psoas mayor, supraespinal y semimembranoso (Andréoletti et al., 2004), así como en fibras nerviosas presentes en el músculo (Garza et al., 2014), también se han encontrado depósitos en la lengua (Casalone et al., 2005; Garza et al., 2014). En el caso de las cabras, se ha descrito también en lengua (Acín et al., 2013) y en los músculos tríceps braquial y bíceps femoral mediante la técnica de Western Blot tras inoculación intracerebral (Acutis et al., 2012).

- Glándula mamaria: la presencia de la PrP^{Sc} en este órgano parece estar relacionada con procesos inflamatorios crónicos causados por el virus Maedi Visna en ovejas. En este órgano la PrP^{Sc} se ha localizado además de en los folículos linfoides, en los conductos galactóforos y en los acinis mamarios. (Lacroux et al., 2008; Ligios et al., 2005). En caprino también se ha detectado en animales coinfectados con scrapie y con el virus de artritis encefalitis caprina (González et al., 2010).

- Glándula salivar: se ha detectado PrP^{Sc} asociada a células epiteliales de los conductos y acinis de las glándulas parótida, mandibular, bucal, palatina y labial de ovejas infectadas de forma natural por scrapie (Vascellari et al., 2007). En cabras sólo se ha podido detectar la PrP^{Sc} en un caso tras su inoculación intracerebral (Acutis et al., 2012).

- Riñón: En ovinos infectados de forma natural se ha demostrado la presencia de la PrP^{Sc}, aunque su localización en dicho órgano genera controversia, entre si dichos depósitos existen en corteza, médula y papila renal (Ligios et al., 2007) o solamente en papila renal (Garza et al., 2014; Sisó et al., 2008). En cabras sólo se ha podido detectar la PrP^{Sc} en un caso tras inoculación intracerebral (Acutis et al., 2012).

- Vejiga: Solo se ha observado depósito de PrP^{Sc} en un caso natural de un ovino, concretamente en las fibras musculares lisas de la pared (Garza et al., 2014).

- Piel: En 2007 se detectó por primera vez, mediante la técnica de Western Blot, la presencia de PrP^{Sc} en la piel de ovejas infectadas de forma natural y mediante inmunohistoquímica (IHQ) en hámster inoculados por vía oral (Thomzig et al., 2007). La localización en este tejido se observó principalmente asociada al SNP, lo que apunta a una posible propagación centrífuga a lo largo de los nervios periféricos. Posteriormente se detectó PrP^{Sc} en piel de ovinos infectados con scrapie de forma natural, mediante las

técnicas de ELISA, (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) e IHQ, en este caso en la epidermis, abarcando los estratos basal, espinoso y granuloso (Garza et al., 2014).

- Pulmón: existen varios trabajos que demuestran la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en pulmón, asociados a folículos linfoides en ovejas que presentan procesos inflamatorios crónicos en este órgano (Garza et al., 2014; Jeffrey & González, 2007; Ryder et al., 2009; Salazar et al., 2010).

- Hígado: Solo un trabajo ha demostrado la presencia de PrP^{Sc} en hígado de ovejas naturalmente infectadas con scrapie, concretamente asociadas a células de Kupffer (Everest et al., 2011).

- Páncreas: Se ha detectado la presencia de PrP^{Sc} en el páncreas de ovejas, concretamente en neuronas parasimpáticas postganglionares (Garza et al., 2014).

- Aparato reproductor y placenta: Mediante técnicas convencionales no se ha detectado PrP^{Sc} en tejidos ni en órganos del aparato reproductor masculino (Wrathall, 1997; Wrathall et al., 2002) ni en el aparato reproductor femenino (Lacroux et al., 2007). Tampoco se ha detectado la proteína patológica en los órganos fetales estudiados ni en el cordón umbilical o en líquido amniótico, ni siquiera en los casos en los que la placenta de esos fetos resultó positiva. En la placenta sí se han encontrado cantidades importantes de PrP^{Sc} por lo que se considera un tejido muy infectivo y que juega un papel importante en la transmisión del scrapie (Gough & Maddison, 2010; Race et al., 1998).

2.4.1. Patogenia y scrapie atípico

La cepa del prion Nor98, causante del scrapie atípico, se caracteriza por una baja o nula implicación del SLR en la patogenia de la enfermedad (Andreoletti et al., 2011; Gavier-Widén et al., 2005). En este caso, aún no está aclarado cómo se produce el proceso de migración, si es que se produce, desde los tejidos inicialmente afectados por la enfermedad hasta el SNC, pudiendo ser éste el único tejido afectado por el proceso. Existe un linfotropismo evidente en el scrapie clásico y la vECJ, menos en la EEB, y todo apunta a que en el scrapie atípico no existe dicho tropismo.

Así mismo, la diseminación centrífuga de la PrP^{Sc} hacia otros órganos fuera del SNC no ha sido aún demostrada en el scrapie atípico. No obstante, sí que se ha confirmado su infectividad mediante bioensayo en algunos tejidos periféricos, como músculos, nervios y tejido linfoide. Por lo tanto, se cree que, a diferencia de otras EET, las muestras que poseen infectividad frente al scrapie atípico pueden ser negativas a los depósitos de PrP^{Sc} habituales (Andreoletti et al., 2011).

Desde la descripción de los primeros casos de scrapie atípico se sabe que, en animales que presentan esta variante de la enfermedad, la distribución del prion no se focaliza principalmente en la médula oblonga, sino que la mayor concentración de proteína priónica se localiza en el cerebelo (Benestad et al., 2003).

Aunque el scrapie se considera generalmente una enfermedad infecciosa, el patrón observado ha llevado a la especulación de que el scrapie atípico Nor98 es una enfermedad esporádica análoga a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádico en los seres humanos. La fuerte asociación con ciertos alelos y la elevada edad de los animales enfermos estaría de acuerdo con esta hipótesis (Moum et al., 2005).

2.5. CUADRO CLÍNICO

Las EET son un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central que se caracterizan por presentar periodos de incubación largos, lo cual hace que los individuos afectados se encuentren de forma subclínica durante cierto tiempo. Una vez iniciada la fase clínica, esta presenta un curso lento e insidioso, que irreversiblemente termina con la muerte del individuo.

En general las EET son difíciles de diagnosticar clínicamente y pueden ser confundidas fácilmente con otras enfermedades debido a la gran variedad de signos clínicos que presentan y a la falta de pruebas de diagnóstico estandarizadas para la confirmación de casos sospechosos *in vivo* (Acín et al., 2021).

El scrapie, afecta a pequeños rumiantes de ambos sexos y se caracteriza por ser una enfermedad insidiosa, no febril, con un periodo de incubación muy variable, dependiendo de la vía, la dosis, la susceptibilidad genética del huésped y la patogenicidad del agente causal. Afecta a animales adultos, produciéndose la mayoría de los casos en animales entre los 1 y 7 años. La muerte del animal, una vez iniciados los signos clínicos, suele ocurrir entre 6 semanas y un año (Vargas et al., 2005). La edad de inicio de los signos clínicos y el periodo de incubación podrían ser considerados iguales dado que la mayoría de los animales se infectan al nacer o en el periodo postparto.

Ocasionalmente la enfermedad puede aparecer en animales de más de 10 años, por lo que se considera que no existe una edad límite para la presentación de los casos (Vargas et al., 2005). Esta aparición en animales muy viejos puede ser debida a un periodo de incubación extremadamente largo o a una exposición al agente causal muy tardía en la vida del animal (Detwiler & Baylis, 2003).

La edad de aparición de los primeros signos y la duración del curso clínico hasta la muerte del animal, han sido asociadas al genotipo del hospedador (Schreuder et al., 1996) observándose que en los animales con genotipo VRQ/VRQ el inicio de los signos clínicos aparece de forma más temprana, mientras que en los animales de genotipo ARQ/VRQ y ARQ/ARQ la aparición de los mismos se produce en animales de más edad, siendo aún más tardía en los animales de genotipo ARR/VRQ.

Al tratarse de una enfermedad neurodegenerativa, los signos clínicos serán predominantemente nerviosos, y pueden verse influenciados por el genotipo y/o la raza del animal. Los primeros signos suelen ser en general cambios en el estado mental y del comportamiento, como

agresividad, nerviosismo y apatía, así como cambios posturales y de locomoción, como intolerancia al ejercicio, hiperestesia, descoordinación, paresia o temblores musculares, entre otros.

A medida que la enfermedad progresa, los animales presentan pérdida de la condición corporal, hiperexcitabilidad, pueden dan saltos inusuales o tener una mirada fija, con la cabeza erguida. Otros signos clínicos suelen ser bruxismo, ataxia, ceguera, temblores o convulsiones, especialmente notables cuando son manipulados (Vargas et al., 2005).

Es común un prurito intenso, que puede aparecer desde fases iniciales de la enfermedad y que lleva al propio animal a rascarse o morderse, produciéndose alopecias y lesiones en la piel. El prurito puede ser observado a nivel de la cabeza, en las orejas, en las extremidades y en la base de la cola. Es posible evidenciar este signo clínico mediante la prueba del rascado, observándose en el animal un mordisqueo reflejo característico debido a dicho prurito, así como relamido de los labios y exteriorización de la lengua (Healy et al., 2003).

En la fase terminal, los animales se muestran deprimidos, con un incremento de la ataxia que hace que el animal sufra caídas y tenga cada vez más dificultades para levantarse, permaneciendo mucho tiempo en el suelo. También sufren una importante pérdida de peso, llegando hasta la caquexia a pesar de conservar muchas veces el apetito. Frecuentemente en esta etapa final se observan fuertes temblores, especialmente de la cabeza y las alteraciones mentales progresan hacia cuadros de estupor y coma, produciéndose finalmente la muerte del animal (Vargas et al., 2005).

2.5.1. Cuadro clínico y scrapie atípico

En el caso del scrapie atípico, los signos clínicos descritos en animales afectados son principalmente descoordinación general del animal, otros como aprensión o nerviosismo y pérdida de condición corporal (Benestad et al., 2008). Estos animales suelen adoptar posturas anómalas y presentan ataxia, sobre todo de las extremidades posteriores, también pueden presentar comportamientos anormales como mordisqueo continuo de la extremidad posterior y episodios de caídas cuando el animal intenta correr.

En algunos animales se ha descrito además dificultad para recolocar las extremidades posteriores, acompañado de descoordinación; ambos signos podrían indicar una afección cerebelar, pero no se observan en todos los casos (Onnasch et al., 2004). A diferencia del scrapie clásico, en los casos descritos de scrapie atípico no se ha observado presencia de prurito. Se puede observar además hipermetría, respuesta anormal a la amenaza o letargia entre otros, aunque todos ellos en frecuencias muy variables (Konold et al., 2007).

No se conoce con exactitud, pero la variabilidad de signos clínicos puede ser debida a la diferencia de duración del estadio clínico, así como al mayor o menor nivel de PrP^{Sc} encontrado en el tejido nervioso.

A pesar de los signos clínicos descritos, es importante resaltar que la gran mayoría de los casos de scrapie atípico han sido diagnosticados a través de programas de vigilancia activa en ovejas aparentemente sanas o animales muertos, y no en animales clínicamente sospechosos.

Este hecho puede ser debido a que los signos clínicos son menos pronunciados que los observados en el scrapie clásico, pero también puede ser resultado de la epidemiología de la enfermedad, ya que a menudo sólo se detectan casos aislados en el rebaño, y los ganaderos podrían no contactar con el veterinario cuando solamente un animal está mostrando signos de enfermedad. Existe un número limitado de casos que fueron detectados a través de sospecha clínica, en los cuales estaba disponible la información detallada de un examen clínico veterinario (Konold et al., 2007).

Las anomalías motoras incluyeron los siguientes aspectos:

- Elevación exagerada de los miembros posteriores al correr, dando la apariencia de "saltos de conejo" (bunny hops), como caminar en trote.
- Marcha tambaleante.
- Torpeza durante la marcha, pérdida de equilibrio cuando se hace girar al animal.
- Entre las alteraciones posturales se puede observar la posición de las extremidades con aumento de la base de sustentación, cruzamiento de las extremidades y posiciones anormales dando una apariencia de "acunado".

2.6. TRANSMISIÓN

La transmisión del scrapie clásico se produce principalmente de forma horizontal por contacto directo entre individuos o de forma indirecta por la contaminación del ambiente (Hoinville, 1996). Se asume que los animales enfermos eliminan PrP^{Sc} a través de las secreciones (leche y saliva) y de las excreciones (orina y heces), así como a través de la placenta y las secreciones vaginales postparto de los animales infectados (Acín et al., 2021). Todos estos productos contribuyen a la contaminación ambiental de forma indirecta, factor muy importante por las características propias del prion: alta estabilidad y capacidad de permanencia en el medio ambiente (Seidel et al., 2007). Esta contaminación puede provocar que animales sanos que convivan en el mismo lugar que animales infectados se puedan infectar por vía oral (Ryder et al., 2009).

Actualmente se considera que la placenta de los animales enfermos es la principal fuente de contaminación del ambiente con priones, por este motivo es de vital importancia un buen manejo higiénico-sanitario del rebaño, especialmente en la época de partos. La falta de eliminación de las placentas en las parideras puede incrementar la posibilidad de aparición de la enfermedad dentro del rebaño (Healy et al., 2004).

Se ha detectado la presencia de PrP^{Sc} en saliva (Maddison et al., 2010), en heces (Safar et al., 2008) y en orina (Gregori et al., 2008; Murayama et al., 2007) de animales infectados, aunque para detectar el agente en estas secreciones y excreciones ha sido necesario el uso de técnicas con alta sensibilidad, como son el bioensayo en ratones transgénicos o la técnica de la PMCA. También se ha encontrado el agente patógeno en restos de canales (Miller & Williams, 2004); y se ha demostrado la capacidad infectiva de la leche y el calostro de ovejas infectadas de scrapie (Konold et al., 2013; Lacroux et al., 2008; Maddison et al., 2009). Todos estos productos se pueden considerar fuentes de contaminación ambiental y por tanto responsables de la infección de nuevos animales por ingestión oral de productos contaminados. No obstante, es difícil relacionar los casos clínicos con las fuentes de infección originales, debido a los largos periodos de incubación característicos de estas enfermedades.

Como ya se ha comentado, la placenta de los animales infectados es considerada la principal fuente de contaminación ambiental de priones en el medio. Numerosos estudios han demostrado una alta infectividad de este tejido, así como una elevada presencia de PrP^{Sc} en el mismo, incluso en la fase preclínica de la enfermedad (Andréoletti et al., 2002; Race et al., 1998; Tuo et al., 2001). Aunque esto podría sugerir la existencia de una transmisión vertical transplacentaria del scrapie, en un principio, mediante técnicas convencionales, no se ha conseguido detectar la proteína prion en tejidos fetales procedentes de madres infectadas, lo que podría sugerir que no existe una transmisión vertical "pura", es decir la que se produce *in útero* (Andréoletti et al., 2002; Caplazi et al., 2004). Sin embargo, estudios posteriores, sí detectaron la presencia de PrP^{Sc} en fetos de ovejas infectadas por scrapie, de manera que los corderos nacerían ya infectados con la enfermedad (Garza et al., 2011; Spiropoulos et al., 2014).

En cualquier caso, se considera muy importante la transmisión materna horizontal, que tendría lugar desde las madres infectadas a su descendencia y a otros animales inmediatamente después del parto a través de la placenta. De hecho, numerosos estudios han demostrado un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad durante los periodos de partos (Hoinville et al., 2010) especialmente si los corderos son criados por madres infectadas, habiéndose demostrado que si los corderos son separados de sus madres y del rebaño inmediatamente después del parto, presentan una menor incidencia de scrapie en la edad adulta que aquellos que no se separan o que se separan más tarde (Elsen et al., 1999; Hoinville, 1996).

La presencia de PrP^{Sc} en la placenta de ovejas infectadas no es constante. De hecho, existen animales en los que no se acumula, y en otros casos se ha encontrado solo en alguna de sus gestaciones, pero no en todas (Race et al., 1998). El factor principal de esta variabilidad parece ser el genotipo del gen *PRNP* de la madre y del feto. En ovejas de genotipo ARR/VRQ con scrapie no se ha encontrado la proteína patológica en la placenta, aunque el feto presentase el genotipo más sensible a la enfermedad, VRQ/VRQ, lo que podría estar asociado a la reducida diseminación de la proteína prion patológica en el organismo de estos animales, que tendría como consecuencia una ineficiente diseminación de la PrP^{Sc} a la placenta (Lacroux et al., 2007). Así mismo se ha comprobado que cuando el feto presenta el haplotipo ARR, resistente al scrapie,

no se detecta proteína prion patológica en la placenta, aunque la oveja tenga genotipo sensible y esté clínicamente enferma (Alverson et al., 2006; Andréoletti et al., 2002; Tuo et al., 2001).

Se han estudiado casos de gestaciones dobles en las que uno de los corderos tenía genotipo sensible y otro genotipo resistente, y los cotiledones de este último presentaban PrP^{Sc} cuando ambos fetos compartían el mismo cuerno uterino. Esto podría ser debido a la existencia de anastomosis sanguíneas entre cotiledones de diferentes fetos (Alverson et al., 2006).

El papel del macho en la transmisión de la enfermedad, no parece desempeñar un papel de gran importancia, ya que no se han encontrado evidencias de que aumente la incidencia de la enfermedad en la descendencia de los machos infectados (Hoinville et al., 2010). Varios estudios han comprobado ausencia de infectividad, en el semen de carneros infectados, mediante bioensayo en ratones transgénicos Tg338 (Sarradin et al., 2008; Wrathall, 1997; Wrathall et al., 2002). Sin embargo, el macho tiene un papel muy importante en los genotipos mayoritarios presentes en el rebaño (Wrathall et al., 2008).

Aunque, como ya se ha comentado, la vía principal de entrada de la PrP^{Sc} al organismo es la vía oral por ingestión de materiales contaminados, experimentalmente se han demostrado como efectivas otras vías de infección como la intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intraocular, conjuntival y por escarificaciones de la piel (Andreoletti et al., 2011; Detwiler & Baylis, 2003; Hunter et al., 2002; Maignien et al., 1999; Mohan et al., 2004; Taylor et al., 1996).

La detección de PrP^{Sc} en la piel de ovinos infectados (Garza et al., 2014; Thomzig et al., 2007) y la demostración de la transmisión cutánea de la enfermedad en un estudio realizado en ratones (Mohan et al., 2005), sugieren el riesgo de que se pueda transmitir la enfermedad por fómites como comederos, bebederos, vallas y otros objetos que los animales puedan utilizar para rascarse. Se demostró que este tipo de objetos que habían estado en contacto con animales infectados, al colocarlos en instalaciones limpias podían infectar a los animales sensibles allí presentes. Así mismo, se confirmó la presencia de PrP^{Sc}, mediante la técnica de PMCA, en los objetos utilizados (Konold et al., 2015).

También hay evidencias de la transmisión de la enfermedad de scrapie de forma iatrogénica por la utilización de vacunas (Agrimi et al., 1999; Caramelli et al., 2001) o por la utilización de instrumentos contaminados con el agente causal (Jeffrey, Martin, et al., 2001; Lawson et al., 2007). Se ha sugerido también la posibilidad de que determinados ectoparásitos pudieran actuar como reservorios y vectores de las enfermedades priónicas, al conseguir transmitir experimentalmente a hámsteres el agente causal del scrapie y la enfermedad crónica caquectizante a partir de larvas de moscas y ácaros que habían sido expuestas a material infectado (Lupi, 2003, 2005), pero esto no ha podido ser demostrado en condiciones naturales.

2.6.1. Transmisión y scrapie atípico

El scrapie atípico se considera una forma no contagiosa de la enfermedad. Su tasa de infección sugiere que podría tratarse de una enfermedad espontánea con influencia genética y la posible participación de factores ambientales y metabólicos (Fediaevsky et al., 2010).

La posibilidad de transmisión en condiciones naturales sería muy baja o nula, ya que no se disemina eficazmente entre animales (Benestad et al., 2008). Sin embargo, esta enfermedad se ha transmitido experimentalmente por vía intracerebral a ovejas de genotipo AHQ/AHQ, ARQ/ARQ, VRQ/ARQ y ARQ/ARR (Cassmann et al., 2021; Okada et al., 2016; Simmons et al., 2007; Simmons et al., 2010) y se ha demostrado su transmisión por vía oral a corderos recién nacidos utilizando una dosis alta de homogeneizado de cerebro (Simmons et al., 2011).

También se ha transmitido experimentalmente por vía intracerebral el scrapie atípico a ratones de las líneas transgénicas ovinizadas Tg338, que sobreexpresa la PrP VRQ (Götte et al., 2011; Griffiths et al., 2010; Le Dur et al., 2005), y TgOvPrP4, que expresa la forma AL RQ 141 (Arsac et al., 2009).

Aunque, en esta variante de la enfermedad, la PrP^{Sc} no se detecta en el tejidos periféricos, sí que ha sido demostrada la infectividad por bioensayo en ratones transgénicos del tejido linfoide, nervios y músculos (Andreoletti et al., 2011; Cassmann et al., 2021) y, aunque estos tejidos representan áreas de preocupación en el contexto de la transformación y posterior reingreso a la cadena alimentaria (Taylor, 2003), es relativamente poco probable que sean una fuente directa de liberación de priones al medio ambiente y se considera poco probable que se transmita en condiciones de campo.

2.6.2. Transmisión interespecie

La eficiencia en la transmisión de las enfermedades priónicas es bastante baja, especialmente cuando el receptor pertenece a una especie distinta al donante (Bruce et al., 1994).

Cuando un prion se transmite entre individuos de la misma especie, el periodo de incubación, los signos clínicos, la neuropatología y las características bioquímicas del agente son muy parecidas o idénticas a las del individuo transmisor. Este hecho quedó demostrado en 1930, con la transmisión del scrapie entre ovinos (Cuillé & Chelle, 1936). Cuando existe un contacto natural o experimental, los priones pueden transmitirse a ciertas especies, pero no a otras (Hill, 2003). La dificultad de un prion de transmitirse de una especie a otra se denomina “Barrera de transmisión”. La barrera de transmisión de las EET parece ser el resultado de una interacción compleja entre los agentes causales de las EET y algunos factores del hospedador, como el genotipo para el gen *PRNP* (Chen & Gambetti, 2002; Scott et al., 2005). Otros factores que intervienen en la transmisión interespecie son la cepa priónica implicada y la vía de inoculación.

Frente a una inoculación de priones interespecie, la barrera de transmisión se pude comportar de forma absoluta, cuando un hospedador es totalmente refractario a la transmisión de priones de otras especies. Un ejemplo de ello puede ser la resistencia del conejo a convertir la PrP^{C} en PrP^{Sc} (Vorberg et al., 2003), o la resistencia de ratones transgénicos que expresan la PrP porcina a diferentes aislados de scrapie clásico (Espinosa et al., 2009).

Esta barrera de transmisión también puede tener un comportamiento parcial; en este caso se presenta una enfermedad subclínica o con periodos de incubación más amplios que los conocidos. Esto pude ser debido a los bajos niveles de conversión de la PrP^{C} en PrP^{Sc} (Race et al.,

1998) lo que se demuestra en ratones transgénicos, portadores de la PrP porcina, inoculados con scrapie atípico, en los que en un primer pase se produce una tasa de ataque muy baja y un periodo de incubación prolongado, incrementándose hasta un 100% la tasa de ataque en un tercer pase con un periodo de incubación mucho menor (Espinosa et al., 2009).

Hay múltiples ejemplos de transmisiones experimentales de varias cepas priónicas entre diferentes especies animales. La EEB se ha transmitido con éxito a ovinos (Andréoletti et al., 2006), a porcinos (Hedman et al., 2016), a monos y a gatos (Collinge et al., 1996) y hay una especie de roedor, el bank vole, que presenta gran susceptibilidad a gran cantidad de cepas priónicas animales y humanas (Igel-Egalon et al., 2018).

La posibilidad de que se generen nuevas cepas priónicas a partir de la transmisión experimental interespecie ha sido planteada en numerosas ocasiones. Sin embargo, es difícil determinar el número de cepas que puede generar el homogeneizado inicial.

También, como se explicará en los estudios de esta tesis, se ha demostrado la transmisión interespecie del scrapie atípico, mediante inoculaciones experimentales de este agente al ganado porcino y bovino. En dichos estudios los animales inoculados no mostraron clínica, y no fue detectado el prion mediante técnicas convencionales. Sin embargo, sí que se observó mediante la técnica de plegamiento incorrecto de proteínas (PMCA), la presencia de priones compatibles con la EEB bovina en los encéfalos de los animales inoculados. Recientemente, otro estudio muy similar realizado en bovinos ha obtenido resultados parecidos (Konold et al., 2023)

2.7 EPIDEMIOLOGÍA

Tras la primera descripción de la enfermedad de scrapie en Reino Unido en 1732, se realizaron nuevas descripciones en Alemania en 1750 y en Francia en 1788, mientras que, en otros países europeos como los países escandinavos, Dinamarca, Holanda, Bélgica y España la enfermedad se describió por primera vez a mediados del siglo XX. Sin embargo, la mayor propagación a nivel mundial ocurrió posiblemente después de la segunda guerra mundial, especialmente por la exportación de ovejas británicas de raza Suffolk y Hampshire a todo el mundo, con la posterior detección de la enfermedad en los lugares de destino. Así, se realizaron las primeras descripciones de la enfermedad en países como Canadá, en 1938; Estados Unidos, en 1947; Australia y Nueva Zelanda, en 1952; Noruega, en 1958; Sudáfrica, en 1964; Colombia, en 1968; Kenia, en 1970, o Brasil, en 1977.

Actualmente, solo Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica parecen estar libres de esta enfermedad (Cosseddu et al., 2007). Hay muchos países en los cuales no se conoce el status sanitario de esta enfermedad, al no existir programas de vigilancia para ello, o basarse solo la detección en métodos de vigilancia pasiva, lo que puede hacer cuestionable el supuesto status de libre de la enfermedad (Detwiler & Baylis, 2003).

Muchos países, continúan siendo zonas endémicas, a pesar de los numerosos esfuerzos realizados por los gobiernos para su erradicación. La falta de pruebas de diagnóstico preclínico

que podrían detectar a los animales portadores y que permitiría realizar muestreos en grandes poblaciones animales, hacen que el control de la enfermedad sea muy complejo. Los países que han conseguido erradicar la enfermedad como Australia o Nueva Zelanda, se mantienen libres de la misma gracias a las estrictas medidas de control de importación y cuarentena, incluyendo además el sacrificio completo de animales importados positivos y de todos los animales con los que han establecido contacto, inmediatamente después de la detección de un brote de la enfermedad (Hoinville, 1996).

En España, tras la aparición del primer caso de EEB, el 22 de noviembre de 2000, se publicó el Real Decreto 3454/2000, por el que se estableció y reguló un Programa Integral Coordinado de Vigilancia y Control de las EET de los animales. A partir de la publicación del Reglamento Europeo 2001/999/EC en el que se establecieron las disposiciones para la prevención, el control y erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles, en España se comenzaron a realizar numerosos muestreos de animales para el diagnóstico de estas enfermedades y a tomarse estrictas medidas de erradicación tras la aparición de animales con resultado positivo. La evolución de los focos y de la vigilancia epidemiológica desde el año 2001 hasta el año 2021 ha sido la siguiente:

Tabla 7. Número de animales analizados y de focos diagnosticados por año.

AÑO	Nº ANIMALES INVESTIGADOS (OVINO Y CAPRINO)	Nº FOCOS
2001	4715	4
2002	50040	15
2003	77486	31
2004	31833	15
2005	73736	38
2006	153131	53
2007	92674	48
2008	54298	38
2009	54314	33
2010	51400	34
2011	41899	35
2012	25243	29
2013	37206	26
2014	41031	22
2015	43067	28
2016	48473	28
2017	48556	28
2018	51303	30
2019	56884	21
2020	56816	20
2021	53640	18
TOTAL	**1147745**	**594**

Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA)

Se puede comprobar una evolución al alza en el número de focos declarados durante los primeros años de la vigilancia, acompañado de un importante aumento en el número de animales investigados, lo que indica que la enfermedad podría haber estado infradiagnosticada en los primeros años de vigilancia. Mientras que, en los últimos años, se observa una estabilización de la incidencia de la enfermedad en nuestro país.

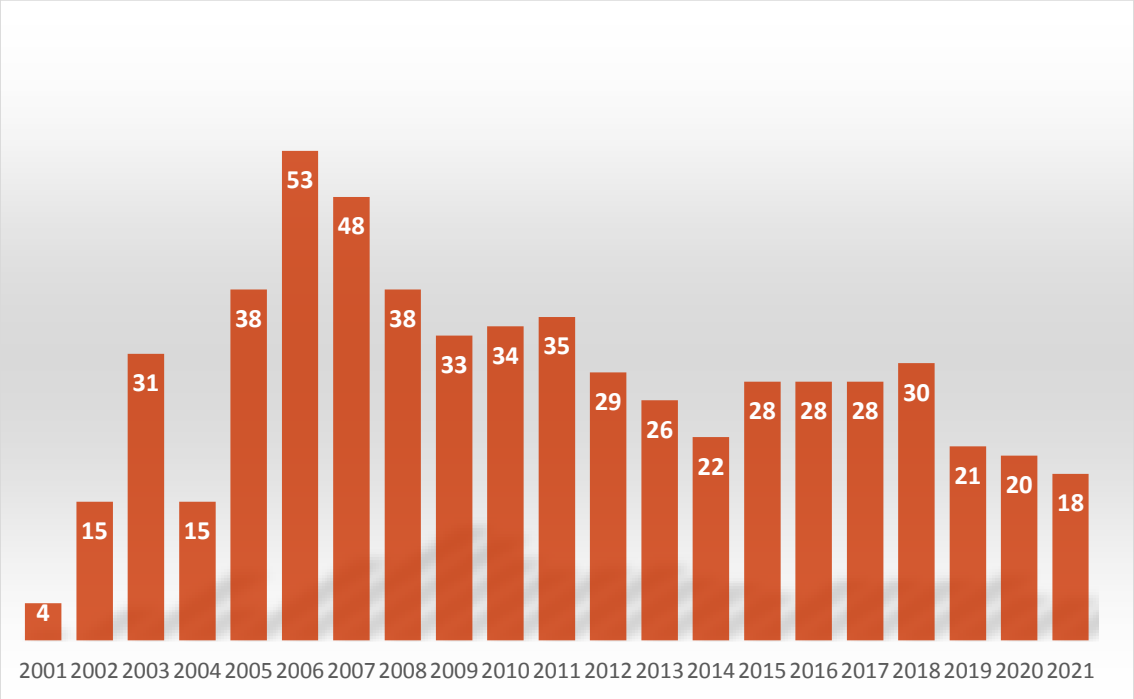


Figura 2. Evolución del número de focos de scrapie/año
Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA)

2.7.1. Epidemiología y scrapie atípico

A partir de la aparición de nuevas técnicas diagnósticas que permitían la caracterización de los diferentes agentes productores EET, en Noruega se describe por primera vez la cepa de prion de scrapie atípico Nor98 en el año 1998 (Benestad et al., 2003), y posteriormente se han ido describiendo casos a lo largo de toda Europa. Al igual que en otros países, en los últimos años está aumentando la incidencia del scrapie atípico en España (MAPA), siendo mayor el número de focos detectados de este tipo que de scrapie clásico.

Tras la aparición de este nuevo tipo de scrapie, se realizó la caracterización de focos de los últimos 15 años (diferenciación entre la variante clásica de la atípica en cada especie) y los resultados fueron los siguientes:

Tabla 8. Número de animales diagnosticados con cada una de las dos variantes de scrapie.

	OVINO		CAPRINO		
AÑO	CLÁSICO	ATÍPICO	CLÁSICO	ATÍPICO	TOTAL
2006	30	15	6	2	53
2007	13	26	4	5	48
2008	10	22	1	5	38
2009	11	18	2	2	33
2010	8	20	1	5	34
2011	9	19	4	3	35
2012	7	16	3	3	29
2013	3	17	2	4	26
2014	4	6	5	7	22
2015	8	12	3	5	28
2016	6	12	5	5	28
2017	12	11	4	1	28
2018	13	9	6	2	30
2019	11	6	2	2	21
2020	3	10	4	3	20
2021	5	6	5	2	18

Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPAMA)

De este estudio de caracterización de los focos de los últimos años se observa la importancia al alza de las cepas atípicas y se intuye que la evolución de la enfermedad no sigue un patrón de comportamiento claro.

Los datos epidemiológicos existentes, muestran que el scrapie atípico está presente en toda Europa, con una prevalencia aproximada de 1 por cada 10.000 ovejas, con independencia de la presencia simultánea o no del scrapie clásico. En estudios que han comparado la prevalencia de scrapie atípico y scrapie clásico en 20 países europeos se ha mostrado que, a pesar de que la prevalencia general es baja con respecto al clásico, el scrapie atípico está presente de forma relativamente constante en todos los países estudiados (Loiacono et al., 2009). Se ha podido comprobar, a través de datos tomados de los test rápidos empleados en 2004, que la prevalencia del scrapie atípico detectada en la población analizada fue bastante similar entre los países estudiados, mientras que, en el caso del scrapie clásico, la variación en las prevalencias observadas era mucho mayor (Buschmann & Groschup, 2005).

A partir de estudios realizados en Noruega y Alemania, se detectaron casos de scrapie atípico en todo el país en comparación con los brotes de scrapie clásico, que se habían concentrado únicamente en ciertas zonas de esos países (Hopp et al., 2006).

Por tanto, se puede afirmar que es una enfermedad poco frecuente, pero muy extendida geográficamente. La ausencia de signos clínicos evidentes en los animales afectados y la escasa mortalidad de animales por esta causa explican, al menos parcialmente, porque la enfermedad ha pasado desapercibida.

La prevalencia exacta de la enfermedad en los países afectados es difícil de determinar por varios factores que hacen que la comparación real entre países resulte complicada.

- No todas las pruebas que se utilizan para la vigilancia de las EET en pequeños rumiantes detectan esta enfermedad.
- Los resultados de las pruebas dependen de la zona del encéfalo investigada, ya que se ha demostrado que los casos atípicos podrían ser negativos, tanto a los test de diagnóstico rápidos empleados habitualmente, como a la técnica de IHQ a nivel del óbex (Buschmann, Biacabe, et al., 2004).
- La muestra de población estudiada (edad, genotipos…) y el diseño del programa de vigilancia puede tener un efecto en el número de animales afectados que puedan ser detectados.

Un estudio realizado en Gran Bretaña identificó que las granjas afectadas por scrapie atípico tenían significativamente un mayor tamaño en comparación con las granjas control, y también un mayor número de movimientos de animales dentro y fuera de la granja (Green et al., 2007).

Otro estudio realizado en Noruega identificó el aporte de un suplemento de vitaminas y minerales en la alimentación como un factor de riesgo para el desarrollo de scrapie atípico, el cual era diferente a un estudio previo del scrapie clásico en Noruega, en el que se identificaron varios tipos de contacto con los infectados por la enfermedad como factores de riesgo (Buschmann, Biacabe, et al., 2004)

2.8. DIAGNÓSTICO

A diferencia de otras enfermedades infecciosas causadas por virus o bacterias, las enfermedades priónicas son difíciles de diagnosticar mediante técnicas convencionales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), serología o cultivos celulares. Esto se debe a que el prion carece de ácidos nucleicos y consta solo de un confórmero plegado anormalmente de la PrP^{C} normal del huésped. Por este motivo el organismo no las reconoce como extrañas y no se produce una respuesta inflamatoria clásica ni inmunológica. Por otra parte, la desigual distribución el agente causal en los tejidos, con altas concentraciones en tejidos de difícil acceso como el sistema nervioso y bajas concentraciones en fluidos corporales de fácil acceso como sangre, orina y heces, complican aún más el diagnóstico laboratorial (Kübler et al., 2003).

Actualmente la confirmación del diagnóstico del scrapie se realiza postmorten a partir de la observación de las lesiones características mediante microscopía óptica (análisis histopatológico) o la detección de la proteína PrP^{Sc} mediante la técnica de IHQ a partir de muestras del SNC (OMSA, 2008).

2.8.1. Diagnóstico antemorten

Para este grupo de enfermedades no existe por el momento un método fiable y seguro de diagnóstico en vivo. Se puede realizar un diagnóstico clínico, pero presenta numerosas dificultades y siempre será presuntivo. Los signos clínicos no son siempre perceptibles ni constantes en todos los animales, pudiendo además confundirse con los de otras enfermedades que afectan al SNC o con otras enfermedades crónicas consuntivas. Además, en el momento del comienzo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, ésta ya estará bastante avanzada por lo que será siempre un diagnóstico tardío.

En el caso del scrapie clásico, la acumulación de la PrP^{Sc} en el sistema linforeticular de algunos de los individuos afectados, en una fase temprana de la enfermedad, ha permitido desarrollar un test de diagnóstico *in vivo* basado en la aplicación de técnicas IHQ sobre muestras de tejido linfoide obtenido mediante biopsia. Se han propuesto las tonsilas como el tejido más apropiado para realizarlas (van Keulen et al., 1996). Diversos estudios demuestran que mediante esta técnica se puede detectar animales infectados con genotipos sensibles en fases preclínicas de la enfermedad, como mínimo un año antes de la presentación del cuadro clínico (Jeffrey, Martin, et al., 2001; Schreuder et al., 1998). Sin embargo, la obtención de la muestra *in vivo* presenta gran dificultad, por el riesgo de la utilización de anestesia general, además de altos costes técnicos y económicos, que implican que no se pueda instaurar como técnica de rutina para un elevado número de animales en los rebaños.

Otros autores proponen el tejido linfoide asociado al tercer párpado para obtener la biopsia, ya que es más accesible que las tonsilas y no requiere anestesia general (Vargas et al., 2006). Una toma de muestras inadecuada, la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en otros tejidos del SLR pero no en el tercer párpado o la ausencia de acumulación de PrP^{Sc} en el SLR hace que esta técnica en ocasiones genere falsos negativos (O'Rourke et al., 2002). Por último, se ha demostrado que el tejido más adecuado para el diagnóstico de la enfermedad *in vivo* es la biopsia de mucosa rectal, dado que se trata de un tejido de fácil accesibilidad, los resultados son reproducibles y se demuestra la presencia de PrP^{Sc} tanto mediante IHQ como Western Blot, pero también en este último caso la ausencia de acumulación de PrP^{Sc} en el SLR es la causa principal de que aparezcan falsos negativos (Monleón et al., 2011).

En animales vivos infectados, la placenta es el único tejido expulsado al medio que presenta acúmulos de PrP^{Sc} detectables por técnicas convencionales y es infeccioso. Por ello, algunos autores han propuesto la utilización de la placenta como tejido para diagnóstico en vivo de la enfermedad (Detwiler & Baylis, 2003; Race et al., 1998).

2.8.2. Diagnóstico postmorten

Tras el descubrimiento de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y la puesta en marcha de la vigilancia activa en el año 2000 se introducen los test de diagnóstico rápido que permiten diagnosticar un elevado número de animales en un tiempo razonablemente corto. Las técnicas rápidas autorizadas por la Unión Europea son distintas variedades de ELISA, que

consiste en la desnaturalización y concentración de la muestra y una posterior incubación con anticuerpos específicos anti-proteína prion y la técnica de Western Blot tradicional modificada que permite acortar tiempos y aumentar el número de muestras utilizando anticuerpos monoclonales (Bolea et al., 2005; Filali et al., 2013).

Estas pruebas requieren una muestra fresca de encéfalo, que en el caso del scrapie clásico deberá corresponder al bulbo raquídeo y tomarse a la altura del óbex. Para asegurar una máxima sensibilidad diagnóstica del scrapie atípico, también deberá analizarse una muestra de cerebelo. En la mayoría de las pruebas rápidas se utiliza menos de 0,5 g de muestra, aunque se aconseja al menos tomar 1 g de muestra de cara a la necesidad de realizar pruebas adicionales (Grassi et al., 2008).

Actualmente se establece que sólo se emplearan los siguientes métodos como pruebas de diagnóstico rápido para el seguimiento de ETT en ovino y caprino:

- ELISA de Bio-Rad TeSeE Sheep/Goat rapid test, que es un inmunoanálisis de doble anticuerpo (método sándwich) para la detección de PrP^{res} (protocolo de ensayo corto), efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración.
- ELISA Bio-Rad TeSeE Sheep/Goat rapid test, para la detección de PrP^{res} con el TeSeE Sheep/Goat Detection kit, efectuado tras una fase de desnaturalización y otra de concentración con el TeSeE Sheep/Goat Purification kit.
- ELISA HerdChek BSE-Scrapie Antigen (IDEXX Laboratories), en el que se utiliza un polímero químico para la captura selectiva de PrP^{Sc} y un anticuerpo de detección monoclonal dirigido contra regiones conservadas de la molécula PrP.

El examen histopatológico del SNC con la observación de lesiones características con el microscopio óptico ha sido tradicionalmente el diagnóstico de referencia (Bolea et al., 2005). Estas lesiones consisten fundamentalmente en cambios degenerativos del SNC que incluyen astrocitosis, vacuolización del cuerpo neuronal y del neuropilo y pérdida neuronal (Acín et al., 2021). Pero a pesar de su utilidad, las lesiones pueden variar y en algunos casos ser mínimas o insuficientes para confirmar el diagnóstico (Begara-McGorum et al., 2000), lo cual, unido a la mayor sensibilidad de otras técnicas ya no se considera como un método de diagnóstico de referencia.

La técnica de IHQ es un procedimiento diagnóstico que permite identificar la presencia de la proteína prion patológica de forma muy eficaz y sensible, incluso en tejidos autolíticos (Debeer et al., 2001; Monleón et al., 2003). Con esta técnica también es posible observar su distribución en el tejido, su localización celular y las características morfológicas de su acumulación (González et al., 2003). Esta técnica permite detectar la presencia de PrP^{Sc} en los tejidos mediante el uso de anticuerpos anti-PrP que se unen a la PrP^{Sc} acumulada, previa digestión de la PrP^{C} mediante proteinasa K. La IHQ es una técnica de alta sensibilidad y especificidad, siendo considerada el método de diagnóstico de referencia por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). Además de servir para diagnosticar una EET, la IHQ se utiliza como método de diferenciación de

cepas: la acumulación de PrP^{Sc} en el encéfalo da lugar a una serie de patrones o tipos de depósitos característicos y diferenciables, cuya magnitud se puede valorar en diferentes áreas neuroanatómicas con el fin de elaborar un perfil inmunohistoquímico.

El diagnóstico mediante Western Blot permite detectar la proteína prion patológica en tejido fresco o congelado en función de su resistencia a la digestión por proteasas, su peso molecular y su reacción frente a anticuerpos específicos. Se realiza mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida (Riek et al., 1996) seguidas de un Western Blot (Pan et al., 1993), de forma que la PrP^{Sc} migra y se separa según su peso molecular presentando un patrón típico de 3 bandas (diglicosilada, monoglicosilada y no-glicosilada). A continuación, son incubadas con un anticuerpo anti-PrP pudiendo así visualizarse dichas bandas. Esta técnica, que presenta una elevada sensibilidad y especificidad, se utiliza para confirmar casos en los que las lesiones neuropatológicas son mínimas o no están presentes, también cuando el tejido se encuentra dañado y no es adecuado para un examen histopatológico o inmunohistoquímico. Al igual que ocurre con la IHQ, la técnica del Western Blot es un método utilizado para la diferenciación de cepas, de manera que el número de bandas detectadas, la altura e intensidad de cada una, e incluso su afinidad a determinados anticuerpos, constituye un patrón de glicosilación particular de cada agente causal (Collinge et al., 1996; Somerville et al., 1997).

Además de estas técnicas de diagnóstico convencionales, existen otras de mayor sensibilidad como son la PMCA y el bioensayo. La PMCA se basa en ciclos de replicación de PrP^{Sc} sobre un sustrato de PrP^{C} y una posterior sonicación para disgregar los polímeros formados y que actúen como "semillas" para continuar la replicación (Castilla et al., 2006). Es una técnica extremadamente sensible que permite amplificar una cantidad inicial de proteína patológica indetectable por las técnicas clásicas. Se ha utilizado en investigación para la detección en vivo de la PrP^{Sc} a partir de fluidos como orina, sangre o líquido cefalorraquídeo (Properzi & Pocchiari, 2013). La PMCA permite la cuantificación de la proteína prion patológica amplificada al existir una relación directa entre la cantidad de PrP^{Sc} inicial en una muestra y el número de ciclos de PMCA necesarios para detectarla (Chen et al., 2010).

Los bioensayos en ratones transgénicos son de gran utilidad para detectar y valorar la capacidad infectiva de muestras procedentes de diferentes órganos y tejidos (Deslys et al., 2001), así como la caracterización de cepas de EET mediante el estudio de las características biológicas de la enfermedad (periodos de incubación, signos clínicos, perfiles lesionales) (Beck et al., 2013; Fraser & Dickinson, 1968). Suelen ser utilizados ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^{C} (Tga20 o Tg338 entre otros).

2.8.3. Diagnóstico del scrapie atípico

En el caso del diagnóstico clínico antemorten del scrapie atípico, puede ser de ayuda la observación de las manifestaciones clínicas más características de esta enfermedad, como son las alteraciones motoras, principalmente incoordinación y pérdida de equilibrio. Estos signos pueden apreciarse de forma más temprana si durante la exploración del animal se les tapa los ojos y se observa su comportamiento, ya que desde fases avanzadas de la enfermedad ya se

pueden apreciar déficits propioceptivos, como marcha tambaleante entre otros. En este caso la realización de biopsias de tejido linfoide no tiene utilidad, ya que, como ya se ha comentado, el agente causal del scrapie atípico no se acumula en el SLR.

En el análisis histopatológico del SNC, también se observa la degeneración espongiforme como principal lesión de estas enfermedades, pero en este caso, el grado de vacuolización es menor en general, presentando el área del óbex muy poca alteración, mientras que, en el cerebelo, el tálamo y los ganglios basales normalmente pueden identificarse lesiones mucho más constantes y manifiestas. Por tanto, desde el punto de vista diagnóstico, deberán tomarse muestras como mínimo del bulbo raquídeo y cerebelo para llegar a un diagnóstico robusto y realizar una clasificación entre clásico y atípico. Además, este perfil lesional atípico se acompaña también de una distribución de la PrP^{Sc} y un patrón de glicosilación diferente al scrapie clásico y, se presenta en animales con genotipos, en principio, resistentes a éste último. Todos estos datos permiten ayudar a diferenciar el scrapie clásico del atípico (Lühken et al., 2007).

En cuanto a los tipos de depósito de PrP^{Sc} observables mediante IHQ en el SNC, en el caso del scrapie atípico, se conocen únicamente 6 patrones de depósitos característicos: fino granular, lineal, perineuronal, en forma de placas, puntiforme y globular (Moore et al., 2008), a diferencia del scrapie clásico, en el que se pueden encontrar hasta el doble de patrones de depósitos, ya que además de los descritos anteriormente (fino granular, lineal, perineuronal y en forma de placas), se pueden encontrar depósitos de tipo intraneuronal, intragial, estrellado, perivascular, subpial, ependimal y subependimal, siendo observables de forma variable en función de cada caso (Acín et al., 2021).

En el diagnóstico por Western Blot, en los casos del scrapie atípico, se han visualizado múltiples bandas, que oscilan entre los 11 y los 31 kDa. Dado que la PrP^{Sc} del scrapie atípico es menos resistente a la digestión con proteinasa K que la PrP^{Sc} del scrapie clásico, las técnicas optimizadas para detectar scrapie atípico emplean una concentración baja de esta enzima en el procedimiento (Arsac et al., 2007; Benestad et al., 2008).

Se trata de una técnica que se emplea a menudo en el diagnóstico del scrapie clásico y es definitiva para la diferenciación con el atípico, sobre todo para confirmar los casos en que las lesiones neuropatológicas son mínimas o no están presentes o el tejido no es adecuado para el examen histopatológico por autolisis, congelación o destrucción de las áreas de localización de las lesiones. Esta técnica permite la detección de la PrP^{Sc} en animales preclínicos que no presentan lesiones en SNC, indicando una mayor sensibilidad de esta técnica respecto al examen histopatológico (Madec et al., 2000).

En el año 2005 la European Food Safety Authority (EFSA) definió los criterios diagnósticos de scrapie clásico y atípico (incluyendo Nor98), basado en el resultado del patrón de transferencia de Western Blot de la proteína prion patológica.

3. ESTUDIO Nº 1. ANÁLISIS DE LA PATOGENIA Y DISTRIBUCIÓN DE LA PROTEÍNA PRION PATOLÓGICA ASOCIADA AL SCRAPIE ATÍPICO EN LA ESPECIE OVINA EN ANIMALES INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE VÍA INTRACEREBRAL.

3.1. INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades priónicas o EET son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan al ser humano y a diversas especies animales. Hasta la fecha, el único agente causal conocido de las EET es el prion o PrP^{Sc} (Prusiner, 1998), un agente no convencional carente de material genético que deriva de un cambio conformacional de una proteína celular normal (PrP^{C}). La PrP^{Sc} induce la transformación de la PrP^{C} en PrP^{Sc}, que tiende a formar agregados principalmente en el SNC.

El scrapie clásico es una EET que afecta a pequeños rumiantes; esta enfermedad se caracteriza por presentar una amplia diseminación de la PrP^{Sc} en tejidos diferentes al SNC (Garza et al., 2014) y altos niveles de transmisibilidad dentro de las poblaciones susceptibles. En 1998, se identificó en Noruega una nueva EET ovina denominada scrapie atípico o Nor98 (Benestad et al., 2003), y posteriormente se han ido describiendo casos esporádicamente en la mayoría de los países europeos (Benestad et al., 2008; Buschmann, Biacabe, et al., 2004; De Bosschere et al., 2004; Nentwig et al., 2007; Onnasch et al., 2004; Orge et al., 2004; Polak et al., 2010; Vidal et al., 2008), en países norteamericanos (Loiacono et al., 2009; Mitchell et al., 2010), las Islas Malvinas (Epstein et al., 2005), Nueva Zelanda (Kittelberger et al., 2010) y Australia (Cook et al., 2016).

Al igual que en otros países, en los últimos años está aumentando la incidencia del scrapie atípico en España (MAPAMA).

Se sabe que los polimorfismos del gen *PRNP* influyen en la susceptibilidad a la infección por scrapie atípico (Benestad et al., 2008; Silva et al., 2018), dándose la mayor incidencia en combinaciones homocigóticas o heterocigóticas de cuatro alelos (AHQ, ARR, ARH y ARQ), mientras que la variante VRQ, la más susceptible al scrapie clásico, rara vez está presente en las ovejas afectadas (Arsac et al., 2009; Benestad et al., 2003; Buschmann, Lühken, et al., 2004; Moum et al., 2005; Saunders et al., 2006).

El scrapie atípico no se disemina eficazmente entre animales (Benestad et al., 2008). Sin embargo, esta enfermedad se ha transmitido experimentalmente por vía intracerebral a ovejas de genotipo AHQ/AHQ (Simmons et al., 2007; Simmons et al., 2010) y ARQ/ARQ (Okada et al., 2016) y más recientemente a ovejas de genotipos VRQ/ARQ, ARQ/ARQ y ARQ/ARR (Cassmann et al., 2021).

También se ha transmitido experimentalmente por vía intracerebral el scrapie atípico a ratones de las líneas transgénicas ovinizadas Tg338, que sobreexpresa la PrP VRQ (Götte et al., 2011; Griffiths et al., 2010; Le Dur et al., 2005), y TgOvPrP4, que expresa la forma ALRQ 141 (Arsac et al., 2009).

La presencia de la PrP^{Sc} parece estar limitada al SNC, ya que existen diferentes trabajos con animales infectados natural y experimentalmente por scrapie atípico, en los que solo se ha detectado el prion en encéfalos utilizando técnicas convencionales como la IHQ o el inmunoensayo, no habiéndose detectado acumulación de PrP^{Sc} en tejidos periféricos (Benestad

et al., 2008; Greenlee, 2019), lo que puede explicar la falta de evidencia significativa para la transmisión natural. Sin embargo, otros estudios, han detectado infectividad en ratones ovinizados susceptibles Tg338 inoculados con tejidos periféricos de ovejas infectadas con scrapie atípico a pesar de ser negativos por IHQ. Los tejidos periféricos que demostraron ser portadores de infectividad incluyeron nervios periféricos, varios tejidos del Sistema Linforreticular (SLR) y músculos (Andreoletti et al., 2011; Cassmann & Greenlee, 2020; Simmons et al., 2011), lo que plantea una preocupación por las posibles fuentes de material infeccioso para la transmisión natural.

Recientemente, en otro trabajo, se demostró la acumulación temprana de PrP^{Sc} en la retina de ovejas inoculadas experimentalmente (Cassmann et al., 2021).

A medida que aumenta la investigación del scrapie atípico, aumenta también su relevancia biológica ya que hay estudios que han demostrado cambios fenotípicos en el scrapie atípico que implican un posible origen del scrapie clásico (Simmons et al., 2015) y de la EEB clásica (Huor et al., 2019).

3.2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el estudio del comportamiento de un aislado priónico de scrapie atípico de origen en Cataluña (España) en ovinos de distintos genotipos, con el fin de estudiar la diseminación de la proteína priónica y comparar el comportamiento de dicho aislado en función del genotipo, así como de la edad del animal en el momento de la infección experimental.

3.3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.3.1. Selección de animales y procedimiento experimental

Para este estudio fueron utilizados un total de catorce animales de la especie ovina, todos ellos eran hembras de la raza churra tensina. Estos animales fueron adquiridos en un rebaño experimental perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y situado en La Finca “La Garcipollera” en Bescós de la Garcipollera (Huesca).

El genotipo de estos animales para el gen *PRNP* fue AHQ/AHQ en 11 de los animales y AHQ/ARR en los 3 animales restantes.

A su llegada al animalario del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, los animales se desparasitaron y vacunaron frente a enterotoxemia y se les realizó una valoración clínica inicial para constatar su buen estado de salud y la ausencia de signos clínicos de ninguna enfermedad.

La experiencia fue realizada en dos etapas; durante la primera se adquirieron ocho ovejas de genotipo AHQ/AHQ con 8 meses de edad y se inocularon 4 meses después, con 1 año de vida.

El inóculo utilizado fue TOA3, realizado a partir de un homogeneizado de tejido encefálico de una oveja 18 meses de edad y genotipo ARQ/ARQ, que presentaba scrapie atípico. Este inóculo fue preparado y suministrado por el grupo de investigación en enfermedades priónicas del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) de Barcelona. (1er pase).

Con el encéfalo de una de estas ovejas, que fue eutanasiada en fase clínica de la enfermedad, concretamente el animal IC-1, se preparó un nuevo homogeneizado para un segundo pase. En esta segunda etapa se adquirieron seis ovejas de entre 3 y 4 meses de vida y se inocularon cuando tenían entre 5 y 7 meses de vida. Tres de estos animales tenían el genotipo AHQ/AHQ y las otras tres ovejas genotipo ARR/AHQ (2º pase).

En las dos etapas el inóculo estaba preparado con tejido encefálico diluido al 10% con suero fisiológico estéril. Cada uno de los animales recibió 0,5 mililitros de estos inóculos que se corresponde con 0,05 gramos de tejido encefálico.

Tabla 9. Relación de ovejas inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico.

Animal	Genotipo	Fecha nacimiento	Fecha inoculación	Edad inoculación (días)
IC-01	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-02	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-03	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-04	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-05	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-06	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-07	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-08	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	367
IC-09	AHQ/AHQ	06/11/2012	29/04/2013	174
IC-10	AHQ/AHQ	30/10/2012	29/04/2013	181
IC-11	AHQ/AHQ	08/10/2012	29/04/2013	203
IC-12	ARR/AHQ	27/10/2012	29/04/2013	184
IC-13	ARR/AHQ	27/10/2012	29/04/2013	184
IC-14	ARR/AHQ	25/10/2012	29/04/2013	186

Para proceder a la inoculación se realizó una pequeña perforación en el hueso craneal con ayuda de un taladro especial para hueso. El lugar de elección fue a nivel del seno frontal a un centímetro de la línea media. Posteriormente se depositó el inóculo en la región frontal de la corteza cerebral, con una aguja hipodérmica de 25G de diámetro. Todo esto se realizó bajo un plano anestésico profundo y posteriormente a la inoculación, se les administró antibioterapia.

Todos los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza con el código PI 13/10. El cuidado y uso de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal recogida en el RD 53/2013, que cumple con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

3.3.2. Vigilancia y valoración clínica

Tras la infección experimental se realizaron observaciones, con una periodicidad semanal, en las que se valoraba fundamentalmente la condición corporal y el comportamiento del animal.

Una vez al mes se realizó una monitorización clínica enfocada a detectar cualquier signo clínico que pudiera estar relacionado con el padecimiento de una encefalopatía. En estas evaluaciones clínicas completas se valoraba el estado mental del animal, evaluando la posible presencia de hiperexcitabilidad, apatía o depresión. También se evaluaban las posibles alteraciones a nivel locomotor, principalmente ataxia, incoordinación o hipermetría, estas pruebas se realizaban primero tapando los ojos del animal, ya que es como se detectan la aparición de los primeros signos clínicos. También se realizaban pruebas de reflejos espinales, de los nervios craneales y la evaluación del sistema músculo esquelético (movimientos de extensión, flexión y lateralización de las extremidades). También se observaba si el animal tenía prurito y se realizaba la prueba de rascado con estímulos en las áreas: cervical, torácica dorsal, lumbar, sacra y caudal.

Mensualmente se realizó una toma de muestras de sangre de los animales inoculados, para ser procesada y separada en plasma, suero y sangre entera.

3.3.3. Recogida de muestras y tejidos de los animales

Todos los animales fueron eutanasiados en la fase clínica de la enfermedad entre los 849 y 2174 días postinoculación, excepto un animal que fue eutanasiado en fase preclínica a los 628 días postinoculación por presentar otra patología. La eutanasia se realizó mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (tabla 10).

Previamente a la eutanasia se realizó una toma de muestras de sangre, con el fin de obtener, suero, plasma, sangre entera y células blancas de la sangre.

Inmediatamente después de la eutanasia se realizó una necropsia completa y sistemática del animal en la que se recogieron muestras de los siguientes órganos y tejidos por duplicado:

SNC: Corteza frontal, núcleos basales, tálamo, hipotálamo, corteza occipital, hipocampo, mesencéfalo, puente, cerebelo, médula oblonga, medula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar.

SNP: Ganglio del trigémino, nervio braquial, nervio ciático, ojo y músculos exoculares.

SLR: Linfonodos mediastínico, mesentérico, retrofaríngeo, submandibular, preescapular, precural, poplíteo e iliaco; bazo, placas de Peyer, tercer párpado y amígdalas.

Tracto Gastrointestinal (TGI): lengua, esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto.

Otros órganos: Pulmón, corazón, hígado, páncreas, músculos tríceps braquial y bíceps femoral, piel de la extremidad posterior a nivel del muslo, riñón, glándula adrenal, vejiga, útero, ovarios y glándula mamaria.

Una de las muestras se guardó en formol tamponado al 10% para el estudio histopatológico e IHQ y la otra se congeló a -80ºC para realizar la técnica de diagnóstico rápido de scrapie ELISA con el kit comercial HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA de la casa comercial IDEXX.

Tabla 10. Relación de animales inoculados vía intracerebral con scrapie atípico con la fecha de eutanasia.

Animal	Genotipo	F. nacimiento	F. inoculación	F. sacrificio	Fase clínica	Días post-inoculación
IC-01	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	13/07/2012	Clínica	849
IC-02	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	08/08/2012	Clínica	875
IC-03	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	06/11/2012	Clínica	965
IC-04	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	06/11/2012	Clínica	965
IC-05	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	19/12/2012	Clínica	1008
IC-06	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	08/04/2013	Terminal	1118
IC-07	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	06/05/2013	Terminal	1146
IC-08	AHQ/AHQ	15/03/2009	17/03/2010	06/05/2013	Terminal	1146
IC-09	AHQ/AHQ	06/11/2012	29/04/2013	17/01/2015	Preclínica	628
IC-10	AHQ/AHQ	30/10/2012	29/04/2013	20/10/2015	Clínica	904
IC-11	AHQ/AHQ	08/10/2012	29/04/2013	15/07/2016	Terminal	1173
IC-12	ARR/AHQ	27/10/2012	29/04/2013	11/02/2019	Terminal	2114
IC-13	ARR/AHQ	27/10/2012	29/04/2013	27/02/2019	Terminal	2130
IC-14	ARR/AHQ	25/10/2012	29/04/2013	12/04/2019	Clínica	2174

3.3.4. Estudio inmunohistoquímico

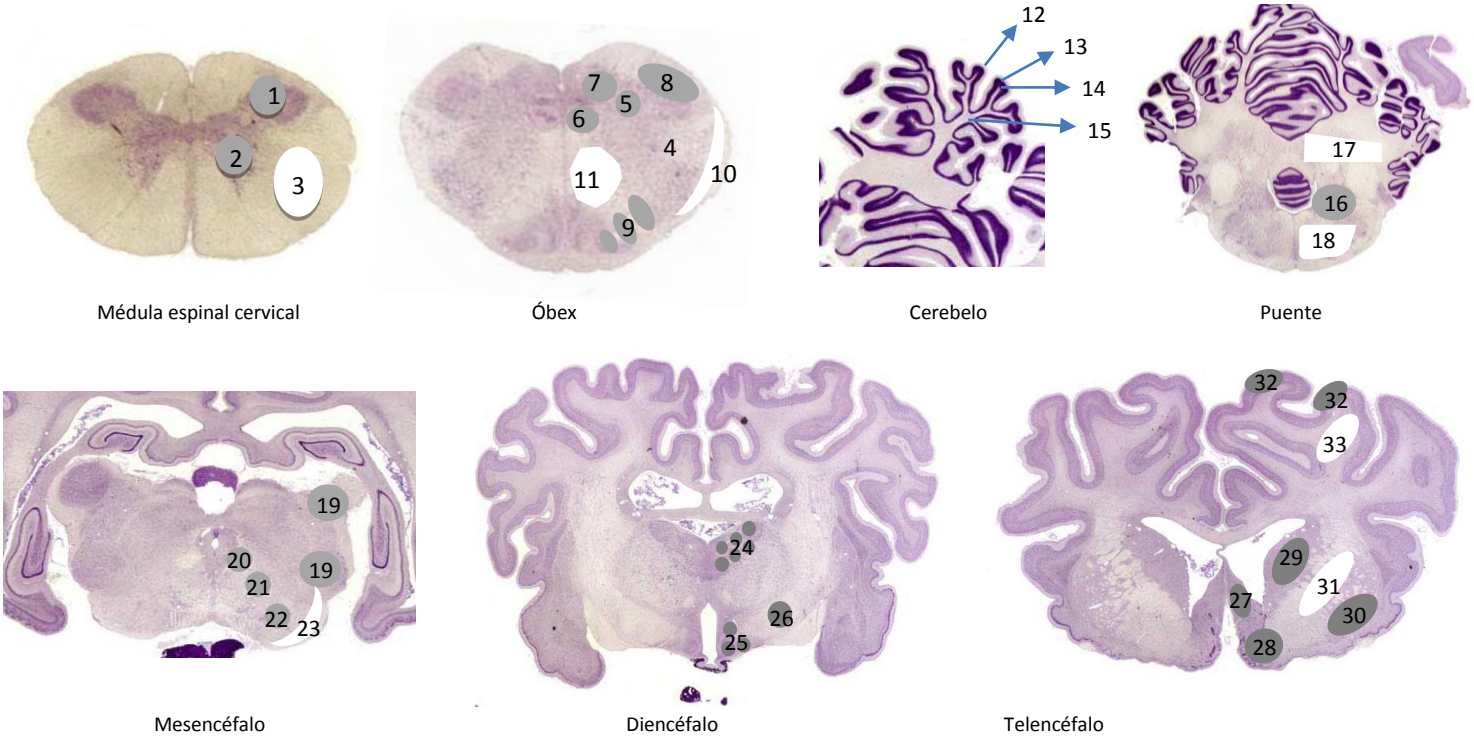
Las muestras recogidas en formol, se mantuvieron durante cinco días para una correcta fijación, y posteriormente se tallaron e incluyeron en parafina siguiendo un procedimiento histopatológico estándar. A partir de cada una de estas muestras, se realizaron cortes seriados de entre 3 y 5 micrómetros de grosor (anexo 1).

Uno de los cortes se procesó mediante la técnica de Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc}, usando el anticuerpo 8G8 formulado contra proteína PrP recombinante humana y que reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos 95 -108 (SQWNKP) en la proteína PrP. Este anticuerpo ha sido probado en numerosos experimentos como el que mejor reconoce la presencia de la proteína prion patológica en los casos de scrapie atípico (Andreoletti et al., 2011).

Para la realización de esta técnica diagnóstica se siguió el protocolo de Monleón y colaboradores (Monleón et al., 2003), que consiste en una serie de pretratamientos para el desenmascaramiento de epítopos con ácido fórmico, proteinasa K y autoclavado hidratado. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo monoclonal 8G8 a temperatura ambiente, durante una hora. El sistema de visualización y el cromógeno utilizados son EnVisionTM (DAKO, Denmark) y diaminobencidina (DAB), respectivamente (anexo 2).

Para realizar el perfil IHQ se valoró de forma subjetiva la intensidad de cada uno de los tipos de depósito de PrP^{Sc} observada en una serie de áreas de diferentes secciones del encéfalo del animal: médula espinal cervical, médula oblonga, cerebelo, puente, mesencéfalo, tálamo, núcleos basales y corteza cerebral (Figura 3).

Figura 3. Áreas del SNC valoradas mediante la técnica de IHQ.



Médula Espinal Cervical: 1: Asta dorsal. 2: Asta ventral. 3: Sustancia blanca.

Óbex: 4: Tracto espinal del nervio del trigémino, 5: Tracto solitario, 6: Núcleo del hipogloso, 7: Núcleo motor dorsal del nervio vago (MDNV), 8: Núcleo cuneado lateral, 9: Núcleos de la oliva, 10: Tracto espinocerebelar, 11: Formación reticular.

Cerebelo: 12: Capa molecular, 13: Células de Purkinge, 14: Capa granular, 15: Sustancia blanca.

Puente: 16: Núcleos vestibulares (lateral, espinal y medial), 17: Deep cerebelar (núcleos cerebelares lateral, intermedio y medial), 18: Formación reticular.

Mesencéfalo: 19: Núcleos geniculados, 20: Núcleo oculomotor, 21: Núcleo rojo, 22: Sustancia nigra, 23: Crus cerebri.

Diencéfalo: 24: Núcleos talámicos (paraventricular, parataenial, anterodorsal, anteroventral, anteromedial, romboide y reticular), 25: Núcleos hipotalámicos (periventricular, ventromedial y arcuate), 26: Núcleo ventral del tálamo.

Telencéfalo: 27: Núcleo septal, 28: Núcleo acumben (ínsulas de calleja), 29: Núcleo caudado, 30: Núcleo lenticular, 31: Cápsula interna, 32: Sustancia gris de la corteza cerebral, 33: Sustancia blanca de la corteza cerebral.

Esta valoración se realizó proporcionando un valor a cada tipo de depósito, en cada área observada, entre 0 (ausencia de depósito) a 3 (gran magnitud de depósito).

Para valorar los distintos patrones de depósito de la PrP^{Sc} tanto en áreas de sustancia gris, como en áreas de sustancia blanca se tomaron como referencia los patrones observados por Moore y colaboradores en 2008 (Moore et al., 2008), aunque también de trataron de identificar otro tipo de depósitos descritos en casos de scrapie clásico (Spiropoulos et al., 2007).

A nivel de la sustancia gris se valoraron 5 patrones de depósito diferentes: particulado fino, el depósito se encuentra en el neuropilo, en forma de un punteado fino; particulado grueso, el depósito se encuentra en forma de un punteado grueso; coalescente, como el particulado grueso, pero estas partículas se fusionan formando masas amorfas o en malla; lineal, formas lineales delgadas en el neuropilo que parecen asociarse a axones neuronales; perineuronal, depósito fino continuo envolviendo el pericarion neuronal y depósito en placa (placas amiloides de PrP^{Sc}) (Kretzschmar, 1993; Richardson & Masters, 1995).

Todos los depósitos de proteína prion patológica observados a nivel de la sustancia blanca se dividieron únicamente en dos tipos: globular, que se caracteriza por la presencia de depósitos en forma ovalada o en forma de anillo, que pueden tener un contorno irregular; y punteado que tienen forma de círculo pequeño o levemente alargados con contorno irregular.

También se realizó la técnica de IHQ para detectar posible presencia de la proteína prion patológica en el resto de tejidos y órganos recogidos durante la necropsia: SNP, SLR, TGI y otros órganos.

3.3.5. Detección de la PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA

Se realizó la técnica ELISA de diagnóstico rápido para scrapie con el óbex y el cerebelo de los animales utilizados en el experimento y recogidos en la necropsia de los animales eutanasiados. También se realizó esta técnica con el linfonodo retrofaríngeo y el bazo de cada uno de los animales para valorar si existía una diseminación del prion al sistema linforreticular. El kit utilizado fue el HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA), de la casa comercial IDEXX. Para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante. Previamente a su análisis, las muestras se descongelaron a 4ºC durante toda una noche. De cada muestra se tomaron 0.35 g para su trituración en un tubo suministrado por el kit y se realizaron 3-4 ciclos de trituración en el Precess 48 (Bertin Technologies) en las muestras de bazo y

linfonodo retrofaríngeo, dejando enfriar los homogenizados entre ciclos y un solo ciclo en las muestras de tejido nervioso (anexo 3).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Evolución clínica de los animales

Los signos clínicos que se encontraron de forma constante en todos los animales estudiados, están relacionados con cambios en el comportamiento e incoordinación motora.

Los primeros signos fueron detectados tapando los ojos de los animales y de esta forma, impidiendo su visión. Al observar su comportamiento en esa situación, los animales que resultaban estar afectados tenían dificultad para mantener la estabilidad y caminar con normalidad sin perder el equilibrio. En reposo presentaban un movimiento de "acunado" lateral o desde atrás hacia delante, y en muchas ocasiones apoyo en base amplia para ayudar a mantener la estabilidad.

Se observó que estos signos se iban haciendo más evidentes, conforme el animal llevaba más tiempo con los ojos tapados o se ponía más nervioso, debido a nuestra presencia y manipulación.

Cuando se realizaba la prueba de tapar los ojos en animales con clínica más avanzada, esta inestabilidad era cada vez más marcada, con incapacidad para desplazarse sin caer al suelo y gran dificultad para levantarse tras estas caídas. Los mismos animales, en condiciones de no privación de la vista, eran capaces de moverse y realizar las rutinas diarias de alimentación, desplazamiento por su alojamiento y en ocasiones de cuidado de sus crías sin grandes problemas, excepto una leve ataxia.

Otro de los primeros signos clínicos detectados fue la observación de una inquietud en el animal con respecto al resto del grupo. Mientras el resto de los animales del lazareto se mantenían agrupados en posición defensiva de rebaño, el animal con clínica presentaba una separación y acercamiento al grupo "deambulando" por el espacio del lazareto en un estado de intranquilidad.

En la figura 4 se observan los signos clínicos más destacados que aparecen en cada animal y los días post-inoculación a los cuales se empezaron a detectar esos signos. Se observa que hay una serie de manifestaciones clínicas que aparecen en todos los animales sin excepción, como son: inestabilidad y acunado, tanto con ojos tapados como en situación de visión normal, ataxia y déficit propioceptivos. Otros signos, frecuentes, pero no constantes, fueron: torneo, intranquilidad, apatía y adelgazamiento.

También se observaron otros signos clínicos, aunque de manera más inconstante, los cuales no están reflejados en esta tabla: lameteo, bruxismo, o temblores. Otros signos, descritos tradicionalmente en el scrapie clásico, como el prurito, no fue detectado en ninguno de los animales estudiados.

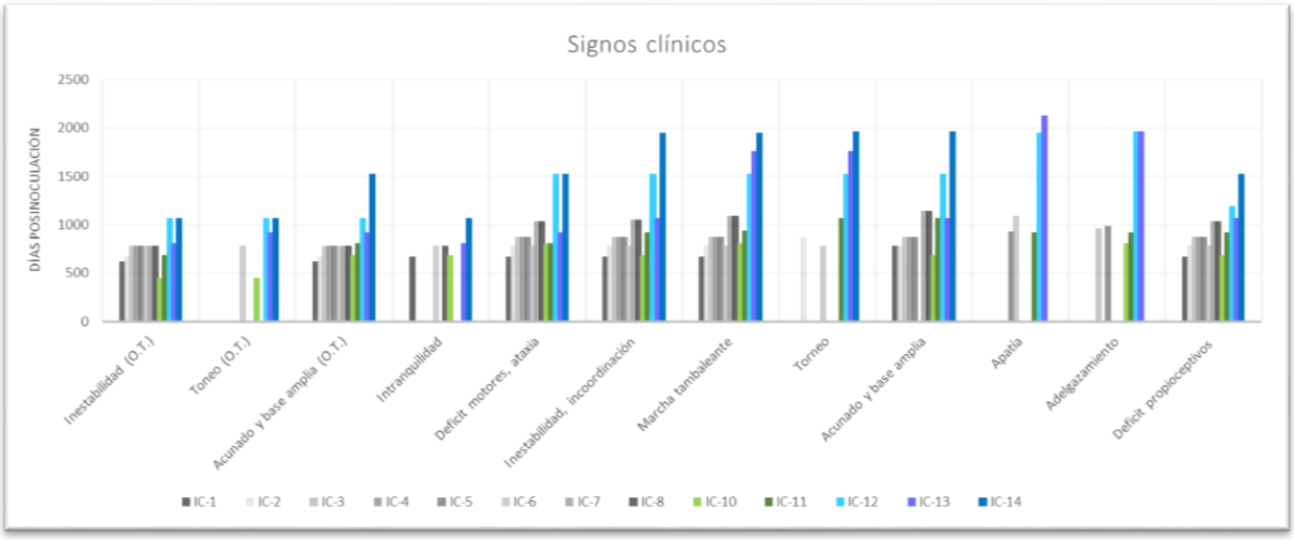


Figura 4. Signos clínicos por animal y fecha de aparición.

En cuanto a la fecha de aparición de las primeras manifestaciones clínicas, hay una amplia variación que oscila entre los 452 y los 1073 días tras la inoculación (tabla 11). Para analizar este dato establecemos los siguientes grupos de animales:

Grupo 1. Ocho ovejas de genotipo AHQ/AHQ inoculadas en la primera etapa con el inóculo TOA 3 cuando contaban con doce meses de vida. Estos animales están representados en el gráfico en diferentes tonos grises.

Grupo 2. Dos ovejas de genotipo AHQ/AHQ inoculadas en la segunda etapa a los 6 meses de edad con un inóculo proveniente de una oveja de la primera etapa. En este grupo inicialmente había tres ovejas, pero una de ellas fue sacrificada por otra patología antes de desarrollar signos clínicos de la enfermedad. Estas dos ovejas están representadas en el gráfico en diferentes tonos verdes.

Grupo 3. Tres ovejas de genotipo ARR/AHQ inoculadas en la segunda etapa a los 6 meses de edad con un inóculo proveniente de una oveja de la primera etapa, representadas en colores azules en el gráfico.

En un primer análisis de estos datos, se puede observar que hay pocas diferencias entre los grupos 1 y 2, compuestos por animales con el mismo genotipo, aunque estén inoculadas con diferente inóculo y a diferente edad; y una diferencia más notable con los animales del grupo 3, de diferente genotipo.

Respecto al periodo de incubación, los animales del grupo 1 mostraron los primeros signos clínicos a los 737± 60 días post-inoculación (dpi), los del grupo 2 a los 570 ± 167 dpi y los del grupo 3 a los 923± 136 dpi. Se detecta un acortamiento en este periodo del grupo 2 respecto al grupo 1, a pesar de que se trata de animales del mismo genotipo. Esta aparición más precoz de los signos clínicos en el grupo 2 podría ser debido a que estos animales fueron inoculados con una edad inferior y la diseminación de la proteína prion por el encéfalo y su multiplicación se

produjo de una manera más rápida. También puede deberse a una adaptación de la cepa inoculada al tratarse de un segundo pase, ya que en caso de los animales del grupo 2, el genotipo del animal donador del tejido inoculado y el animal inoculado presentan el mismo genotipo para el gen *PRNP*. Esto está en concordancia con los resultados de una inoculación experimental realizada por Simmons y colaboradores en 2010, donde el periodo de incubación de la enfermedad disminuyó de 790 a 695 días en los animales inoculados con un segundo pase de scrapie atípico (Simmons et al., 2010).

Los animales del grupo 3 mostraron un aumento en el periodo de incubación de la enfermedad, respecto a los dos grupos anteriores. Esto parece indicar una menor susceptibilidad de los animales de genotipo ARR/AHQ a esta variante de scrapie con respecto a los animales de genotipo AHQ/AHQ, ya que los grupos 2 y 3 fueron inoculados con el mismo homogeneizado y a la misma edad.

El periodo de patencia, considerando como tal, el periodo entre la detección de los primeros signos clínicos y la eutanasia del animal por haber alcanzado una fase muy avanzada o terminal de la enfermedad fue muy variable. Este dato oscila entre los 188 y los 1322 días tras la aparición de los primeros signos clínicos, días post clínica (dpc).

Tabla 11. Días de intervalo entre inoculación, inicio de síntomas y eutanasia de todas las ovejas inoculadas intracerebralmente con scrapie atípico.

	ANIMAL	INT INOC-CLÍN	INT CLÍN-EUT	INT INOC-EUT
GRUPO 1	IC-01	625	224	849
	IC-02	669	206	875
	IC-03	777	188	965
	IC-04	777	188	965
	IC-05	715	293	1008
	IC-06	777	341	1118
	IC-07	777	369	1146
	IC-08	777	369	1146
GRUPO 2	IC-10	452	452	904
	IC-11	689	484	1173
GRUPO 3	IC-12	888	1226	2114
	IC-13	808	1322	2130
	IC-14	1073	1101	2174

Si comparamos los datos de los tres grupos de animales, encontramos los valores más bajos en el periodo de patencia en el grupo 1, que fue de 272 ± 80 dpc, un poco más largo fue el curso de la enfermedad en el grupo 2 con 468 ± 23 dpc, teniendo en cuenta que este segundo grupo de animales tuvo un menor periodo de incubación, ya que los síntomas se detectaron antes, el periodo de supervivencia en ambos grupos fue muy similar, ya que la eutanasia en el grupo 1 se produjo a los 1009 ± 118 dpi y en el grupo 2 a los 1039 ± 134 dpi.

Esta diferencia en el periodo de incubación, puede deberse, como hemos comentado anteriormente, a la diseminación más rápida de la proteína prion hasta el encéfalo por la menos edad de los animales del grupo 2 en el momento de la inoculación y a la adaptación de la cepa inoculada al tratarse de un segundo pase, y tener el mismo genotipo para el gen *PRNP* los animales donadores y receptores del tejido nervioso inoculado.

El hecho de que ambos periodos se igualen si comparamos periodo de supervivencia, indica que la enfermedad tiene una evolución clínica más lenta en el segundo grupo de animales, esto podría ser debido a que la menor edad de estos animales los hace más resistentes a complicaciones secundarias de la enfermedad como anorexia, postración, traumatismos por caídas, disfagias.

Donde sí que existen unas claras diferencias es en el grupo 3, donde el periodo de patencia fue de 1216 ± 110 dpc y el periodo de supervivencia de 2139 ± 31 dpi. Los animales de este grupo, además de empezar a mostrar los signos clínicos significativamente más tarde que los otros dos grupos, tuvieron también un desarrollo de la enfermedad mucho más lento. Las 3 ovejas pertenecientes a este grupo estuvieron más de 3 años con manifestaciones clínicas de menor a mayor intensidad a lo largo del tiempo, hasta alcanzar el grado de clínica muy intensa o terminal en el que fueron eutanasiados todos los animales del experimento. Esto vuelve a poner de manifiesto la mayor resistencia de los animales de genotipo ARR/AHQ a la enfermedad respecto a los animales AHQ/AHQ.

3.4.2. Patrón de distribución de la proteína prion

En el estudio inmunohistoquímico de las muestras procedentes del SNC de las ovejas inoculadas, se valoró el tipo de depósitos de PrP^{Sc}, así como la intensidad y distribución de dichos depósitos mediante un análisis subjetivo de los distintos cortes, a través del microscopio óptico. Se le asignó a cada área un valor numérico entre 0 y 3, tomándose como referencia para establecer las magnitudes la figura 1 del artículo de González y colaboradores de 2005: 0 = sin depósito; 1 = depósito leve; 2 = depósito moderado; 3 = depósito severo (González et al., 2005).

Los depósitos de PrP^{Sc} se observaron en todas las muestras recogidas, a lo largo de todo el SNC, independientemente del tiempo de exposición de cada animal. Sin embargo, la localización más destacable fue a nivel del cerebelo, tal y como señalan otros estudios realizados anteriormente (Benestad et al., 2003). Este hallazgo está en consonancia con la evaluación clínica de los animales, en la que se observaba una afectación principalmente del sistema motor y propioceptivo, controlado a través del sistema cerebeloso.

En el caso de la oveja eutanasiada de forma precoz, debido a otras patologías ajenas al estudio, y que no presentó ningún signo clínico compatible con la enfermedad, también se encontró acumulación de PrP^{Sc} principalmente en el área del cerebelo y del tálamo, lo que concuerda con otros estudios que establecen que la invasión de las áreas "diana" de esta enfermedad se producen al inicio de la infección (Benestad et al., 2008; Monleón et al., 2011; Tranulis et al., 2011).

El estudio IHQ por distintas áreas fue el siguiente:

Óbex. En esta zona, al contrario de lo que ocurre en los animales afectados por scrapie clásico, se encontró poca intensidad de inmunotinción en todos los animales observados. En la sustancia blanca se veía una distribución muy homogénea de tipo punteado y globular de baja intensidad, entre 0,5 y 1. En los núcleos de la sustancia gris, compuestos por agrupaciones de neuronas, se observó algo de tinción en el neuropilo, de tipo granulado fino. En algunos animales esta tinción era ligeramente más intensa en la formación reticular y en el tracto espinal del trigémino, mientras que el núcleo dorsal del nervio vago era una de las zonas más pobremente teñidas.

Cerebelo. Como ya se ha señalado, la mayor intensidad de tinción se localizó en el cerebelo, especialmente en la capa molecular, donde todas las muestras, excepto la del animal eutanasiado de forma prematura, obtuvieron una calificación en su intensidad de más de 2,5, siendo de 3 en la mayoría de los casos. El tipo de depósito encontrado en esta capa fue, principalmente, granulado fino, aunque en varias zonas se organizaba en forma de depósito lineal. También se vio en algunas zonas que ese granulado fino se unía dando lugar a un depósito tipo coalescente. En algunos animales, también se encontró en esta capa molecular, un patrón laminar, con una intensidad de inmunotinción más intensa en la zona más externa de la capa y de menor intensidad en la zona más interna.

En la capa granular del cerebelo se observaba menos intensidad de depósito a priori, pero esto puede deberse a que en esa capa se encuentran todas las neuronas, y éstas no están teñidas en el scrapie atípico. Sin embargo, toda la zona del neuropilo mostraba, en todos los animales clínicos, gran cantidad de tinción, por lo que se le dio una calificación a su intensidad de entre 2,5 y 3, siendo toda de tipo granulado fino.

En ningún caso se observó tinción en las células de Purkinje, mientras que en la sustancia blanca del cerebelo se observó depósito tipo globular y de tipo punteado muy similares a los presentes en otras áreas del encéfalo, pero de una intensidad algo mayor.

Puente. En el corte de puente se observó mayor variabilidad en la intensidad de tinción entre los diferentes animales, sin encontrar una correlación entre esto y los diferentes genotipos o momentos de inoculación ni con las manifestaciones clínicas de cada animal. En todos los casos se observó inmunotinción en la sustancia blanca a nivel de la formación reticular, los núcleos vestibulares, el pedúnculo cerebelar y el Deep cerebelar con una distribución bastante homogénea de depósito de tipo globular y punteado. Sin embargo, las intensidades variaban entre 0,5 y 1 en algunos animales, alcanzándose valores próximos al 3 en otros, especialmente

en la zona de Deep cerebelar. En ninguno de los animales se observó ningún tipo de tinción en el interior de las neuronas.

Mesencéfalo. En esta zona del encéfalo, se encontró en todos los animales una distribución homogénea de tipo puntiforme con una intensidad media entre 1 y 1,5. En casi todos los casos, esta inmunotinción aumentaba de intensidad hasta 2 en las zonas de núcleos geniculados y Crus cerebri, encontrándose en esta última zona en un animal (IC-12) un leve patrón lineal.

Diencéfalo. Fue otra de las áreas en las que se observó una mayor inmunotinción. La zona que presentaba un nivel mayor de depósito era la de los núcleos talámicos, más concretamente a nivel del núcleo ventral del tálamo, en el cual, además de aparecer el depósito puntiforme habitual, se encontró en 4 de los 14 animales analizados un depósito de PrP^{Sc} en placa, que se corresponde con zonas de depósito de amiloide y que ha sido descrito como habitual en animales afectados con scrapie atípico (Benestad et al., 2003; Jeffrey et al., 1998).

Telencéfalo. También se observó una cantidad evidente de depósito de proteína prion a nivel de los núcleos basales, principalmente en la cápsula interna (sustancia blanca), en la cual se encuentran el núcleo caudado y lenticular, ambos íntimamente relacionados con el movimiento muscular voluntario.

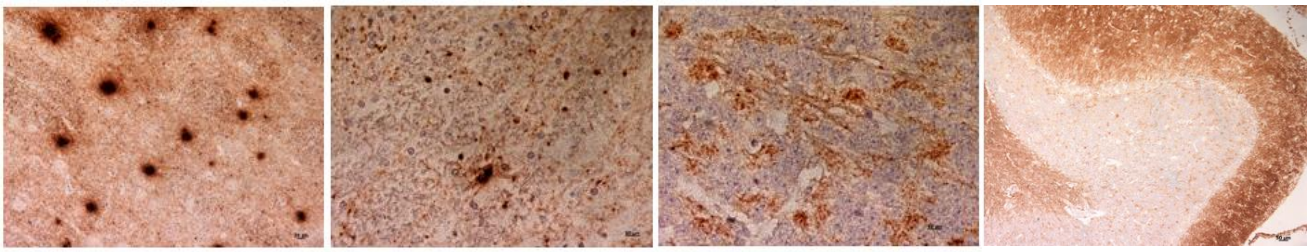


Figura 5: Imágenes de distintas áreas del SNC ovino, dónde se pueden observar mediante la técnica de IHQ los distintos tipos de depósito que aparecen en el Scrapie atípico; a) Depósito en placa y puntiforme a nivel del tálamo (núcleos talámicos) (40x); b) Depósito de tipo coalescente y punteado grueso a nivel de núcleos basales (40x); c) Depósito de tipo puntiforme a nivel de la capa granular del cerebelo (40x); d) Imagen de capa molecular de cerebelo con gran depósito de PrP^{Sc}, de tipo puntiforme (10x).

A diferencia de lo encontrado en el estudio clínico, en este caso no se observaron diferencias entre grupos de animales en función de su genotipo, ya que todos los animales mostraron un patrón similar y homogéneo tanto a nivel de intensidad de depósito como en la presencia de distintos patrones y, aunque se pueden observar algunas diferencias entre muestras, como es el caso de la aparición de depósitos de placa de amiloide en el tálamo, no se pudo asociar ni a un genotipo específico ni a la edad del animal.

También se realizó una búsqueda pormenorizada en el SNP y en el resto de órganos y tejidos recogidos de los animales. En el caso del SNP, se encontró positividad en el bulbo olfatorio, nervio óptico y la retina. En el caso particular de la retina, el inmunomarcaje se localizó en las capas plexiforme externa e interna, con ausencia de depósitos en las células ganglionares que se describen como positivas en el scrapie clásico (Hortells et al., 2006).

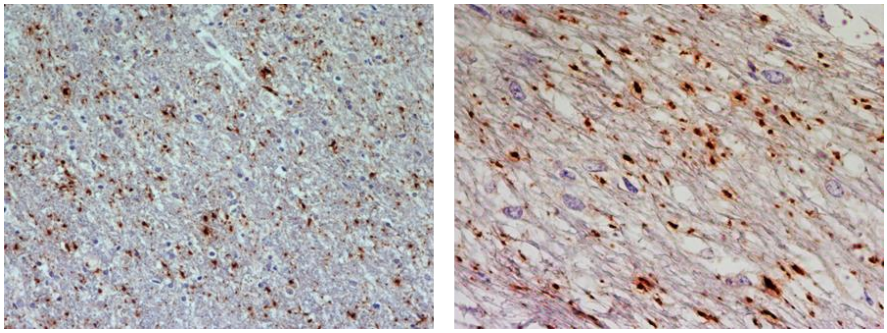


Figura 6: Imágenes de distintas áreas del SNP ovino, dónde se pueden observar depósito de PrP^{Sc} mediante la técnica de IHQ con el anticuerpo 8G8; a) bulbo olfatorio, b) nervio óptico.

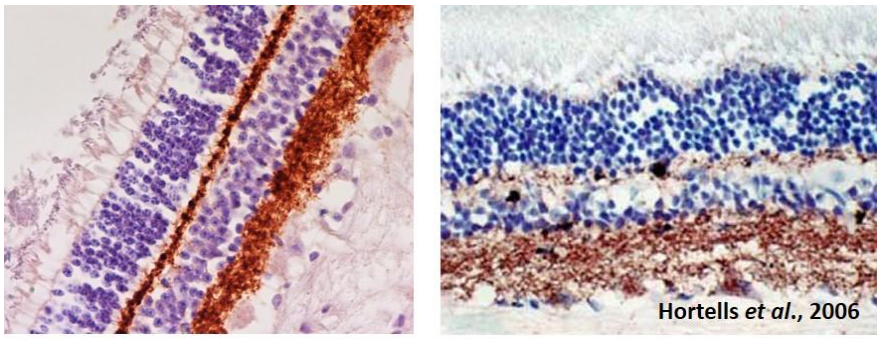


Figura 7: Imagen de retina de una oveja inoculada con scrapie atípico por vía intracerebral tras la técnica de IHQ con el anticuerpo 8G8 e imagen de Hortells y colaboradores de 2006, de retina de oveja afectada por scrapie clásico tras la técnica de IHQ con el anticuerpo L42.

En el resto de tejidos y órganos estudiados no se pudo encontrar positividad en ningún caso, lo que vuelve a poner de manifiesto la nula diseminación del scrapie atípico por tejidos periféricos, al menos si la detección de la proteína prion se lleva a cabo con técnicas IHQ.

3.4.3. Resultados de la técnica ELISA de diagnóstico rápido para scrapie

El kit de diagnóstico ELISA utilizado fue el HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA), de la casa comercial IDEXX.

El resultado de esta técnica rápida realizado con las muestras de cerebelo y óbex, fue positivo para todas las ovejas, incluso en el animal sacrificado antes de desarrollar signos clínicos. Sin embargo, esta misma técnica realizada con muestras de bazo y linfonodo retrofaríngeo de todos los animales, arrojó un resultado negativo en todos los casos.

Estos resultados ponen de manifiesto la escasa o nula participación que el SLR tiene en la diseminación del agente del scrapie atípico hasta el SNC, por lo que otros estudios exponen que la diseminación podría ser realizada solo por transporte axonal (Benestad et al., 2008; Monleón et al., 2011; Tranulis et al., 2011).

3.5. DISCUSIÓN

Todos los animales inoculados por vía intracerebral mostraron signos clínicos, excepto uno, que fue eutanasiado de forma temprana por presentar otra patología a los 628 días postinoculación, sin haber mostrado aun sintomatología clínica asociada a scrapie. Los signos clínicos, de tipo neurológico, fueron muy similares en los dos genotipos ensayados, encontrándose principalmente déficits propioceptivos, ataxia, hipermetría y posturas anómalas. Este abanico de signos clínicos fue comparable a otros estudios de scrapie atípico experimental en ovejas de genotipos AHQ/AHQ (Simmons et al., 2007; Simmons et al., 2010) y ARQ/ARR (Cassmann et al., 2021).

Sin embargo, en otros estudios de inoculación intracerebral realizados a animales ARQ/ARQ no se han detectado signos clínicos, a pesar de haberse mantenido los animales con vida hasta los 7 u 8 años tras la inoculación y, a pesar de haberse detectado positividad mediante IHQ tras el sacrificio (Cassmann et al., 2021; Okada et al., 2016).

El periodo de incubación, considerando como tal el intervalo entre la inoculación y la observación de los primeros signos clínicos, fue más corto (177 días de media) en los animales del primer pase, todos AHQ/AHQ y los del segundo pase de genotipo AHQ/AHQ. Aunque, se trata de un número de animales demasiado pequeño para sacar conclusiones sólidas de esta observación, ya que solamente dos animales AHQ/AHQ del segundo pase llegaron a la fase clínica, esta diferencia parece indicar una adaptación de la cepa inoculada y está en concordancia con lo obtenido en otro estudio de inoculación intracerebral de scrapie atípico en animales de este genotipo (Simmons et al., 2010).

El presente trabajo es el primero realizado con animales de genotipo ARR/AHQ y, como ya se ha indicado, los animales mostraron el mismo espectro de signos clínicos, característicos de scrapie atípico, que el resto de genotipos estudiados hasta el momento, en este trabajo y en otros citados. Sin embargo, en los animales de este genotipo sí que hubo diferencias en el periodo de incubación de la enfermedad, que fue más elevado (214 días de media), pero lo más llamativo fue que la progresión de los signos clínicos tras su aparición fue significativamente más lenta, ya que estos animales sobrevivieron en fase clínica durante más de 3 años, mientras que los animales de genotipo AHQ/AHQ, sobrevivieron de media algo menos de un año.

Aunque los criterios para realizar la eutanasia fueron los mismos en todos los casos, basados en la incapacidad del animal de alimentarse, beber o levantarse del suelo sin ayuda, quizás los animales de genotipo ARR/AHQ fueron eutanasiados más prematuramente, por establecer un punto final al experimento, ya que, aunque se encontraban en fase clínica avanzada, aun mostraban autonomía en sus funciones vitales y pensamos que podían haber sobrevivido más tiempo, en las condiciones de estabulación intensiva y en pequeños grupos en los que se encontraban, lo cual pone aún más de manifiesto el curso más lento de la enfermedad en este genotipo.

Otro estudio con inoculación intracerebral de scrapie atípico en ovejas de genotipo ARQ/ARR, establece el periodo entre la inoculación y la eutanasia por enfermedad neurológica, entre los 4,9 y los 6,7 años (Cassmann et al., 2021). Aunque resulta complicado comparar estos resultados con los hallados en este trabajo, ya que no indica la fecha de inicio de los signos clínicos, parecen acercarse más a lo observado en nuestros animales ARR/AHQ.

Estos resultados muestran que, la patología clínica observada en el scrapie atípico parece ser independiente del genotipo en lo que respecta a sus manifestaciones, pero dicho genotipo tiene influencia en el periodo de incubación, la duración del curso de la enfermedad y la esperanza de vida de los animales clínicamente enfermos.

En todos los animales analizados se observó el depósito de PrP^{Sc} mediante la técnica de IHQ en el encéfalo, incluso en el animal eutanasiado en fase preclínica por otra patología concomitante. La distribución observada de esta PrP^{Sc} fue equiparable a otros estudios de Scrapie atípico natural o experimental en ovejas (Benestad et al., 2003; Moore et al., 2008; Simmons et al., 2007), con depósitos granulares de mayor intensidad en cerebelo y granulares de menor intensidad y punteado en otras zonas del encéfalo como corteza cerebral, núcleos basales, tálamo, mesencéfalo y puente. Estos depósitos eran de muy poca intensidad en la zona del óbex y concretamente en el núcleo dorsal del nervio vago, localización que junto con el tejido linfoide se considera uno de los primeros sitios de acumulación en el scrapie clásico (Greenlee, 2019).

En todos los animales, de ambos genotipos, el perfil de depósito observado por IHQ fue muy similar, excepto en el animal sacrificado de manera prematura en fase preclínica que solo presentó depósito de prion en cerebelo y tálamo.

Estos hallazgos corroboran, como ya han sugerido otros autores, que el óbex, región del tronco encefálico, muestreada en el diagnóstico estándar del scrapie, no es el sitio óptimo para confirmar la presencia de PrP^{Sc} durante la fase inicial del scrapie atípico (Benestad et al., 2008; Benestad et al., 2003) y que, en contraste con la variación generalizada en las características patológicas e inmunopatológicas observadas en la variante clásica (Spiropoulos et al., 2007), la patología observada en los casos atípicos parece ser mucho más consistente, independientemente del genotipo (Benestad et al., 2003; Gavier-Widén et al., 2005; Moore et al., 2008; Onnasch et al., 2004).

Al igual que en estudios previos, no se detectó PrP^{Sc} mediante IHC en los tejidos linfoides o periféricos de ninguna oveja; permaneció confinado al SNC (Andreoletti et al., 2011; Cassmann & Greenlee, 2020; Simmons et al., 2011). Esta ausencia de depósito en otros tejidos es consistente a lo observado en casos naturales de scrapie atípico (Simmons et al., 2007) y no se puede atribuir a la vía de transmisión experimental, ya que en animales inoculados por la misma vía con scrapie clásico si se detecta depósito generalizado de PrP^{Sc} en tejidos linfoides (Cassmann et al., 2021).

Sin embargo, algunos de estos trabajos han reportado infectividad en ratones ovinizados inoculados con tejidos periféricos de ovejas infectadas con scrapie atípico, a pesar de que estos

tejidos fueran negativos por IHQ. Los tejidos periféricos que demostraron ser portadores de infectividad incluyeron nervios periféricos, varios tejidos linfoides y el músculo ocular externo (Andreoletti et al., 2011). Esto indica la necesidad de seguir investigando en este campo, ya que, a partir de los tejidos linfoides infectados, los priones podrían ser transportados por la linfa hasta la circulación sanguínea y de ahí salir del animal en forma de secreciones o excreciones de la misma manera que sucede en el scrapie clásico (Wrathall et al., 2008).

En la búsqueda pormenorizada de depósitos de PrP^{Sc} por el SNP, se encontró positividad en bulbo olfatorio, nervio óptico y retina en animales de ambos genotipos, encontrándose en esta última el inmunomarcaje en las capas plexiforme externa e interna, con ausencia de depósitos en las células ganglionares que se describen como positivas en el scrapie clásico (Hortells et al., 2006). Mientras que en la mayoría de estudios previos no informan de este hallazgo en retina (Benestad et al., 2003; Kittelberger et al., 2010; Matsuura et al., 2019; Okada et al., 2016; Simmons et al., 2007), otro trabajo más reciente sí que ha descrito la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en retina mediante IHQ en ovejas de genotipo ARQ/ARQ y ARQ/ARR principalmente en las capas plexiformes interna y externa, aunque en este caso también se observó un marcado mínimo en las capas de células ganglionares y nucleares (Cassmann et al., 2021). Esto parece indicar que, el tejido retiniano es una zona susceptible de ser invadida por la PrP^{Sc} independientemente del genotipo del animal, y que merece la pena prestar atención y profundizar en su estudio en nuevos trabajos.

4. ESTUDIO Nº 2. ESTUDIO DE LA INFECTIVIDAD DE LAS PLACENTAS PROCEDENTES DE OVINOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE VÍA INTRACEREBRAL CON EL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO.

4.1. INTRODUCCIÓN

Se han descrito varias EET cuyo origen se asocia a la ingestión por vía oral de material contaminado con el agente. Entre ellas podemos incluir el scrapie clásico en ovejas y cabras, la EEB, la ECC en alces y ciervos, o la vECJ en los seres humanos (Beekes & McBride, 2007).

Se conoce que la transmisión del scrapie clásico se produce principalmente de forma horizontal por contacto directo entre individuos o de forma indirecta por la contaminación del ambiente (Hoinville, 1996). Se asume que los animales enfermos eliminan PrP^{Sc} a través de las secreciones (leche y saliva) y de las excreciones (orina y heces) (Wrathall et al., 2008) contaminando el ambiente y provocando que animales sanos que convivan en el mismo lugar que animales infectados se puedan infectar por vía oral (Ryder et al., 2004).

Sin embargo, la principal fuente de contaminación ambiental de priones en el medio, en el caso de los animales con scrapie clásico, se considera la placenta de los animales enfermos. Numerosos estudios han demostrado una alta infectividad de este tejido, así como una elevada presencia de PrP^{Sc} en el mismo, incluso en estados preclínicos de la enfermedad (Andréoletti et al., 2002; Tuo et al., 2002). Esto podría sugerir la existencia de una transmisión vertical transplacentaria del scrapie, aunque en principio, la ausencia de detección de PrP^{Sc} en tejidos fetales procedentes de madres infectadas mediante técnicas convencionales sugería que no existe esa transmisión vertical "pura", es decir la que se produce *in útero* (Andréoletti et al., 2002; Caplazi et al., 2004; Onodera et al., 1993). Sin embargo, estudios más recientes sí han detectado la presencia de PrP^{Sc} en fetos de ovejas infectadas por scrapie, de manera que los corderos nacerían ya infectados con la enfermedad (Foster et al., 2013; Garza et al., 2011).

En el scrapie atípico no se ha demostrado aún la transmisión oral de forma natural. Todo apunta a que se trata de una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, que aparece de manera espontánea en animales con genotipos aparentemente resistentes al scrapie clásico, y cuya transmisión no ha sido aún aclarada. Basándonos en esta hipótesis, la posibilidad de transmisión en condiciones naturales sería muy baja o nula, y por tanto el papel de la placenta en la transmisión, insignificante. Sin embargo, sí que ha sido posible la transmisión experimental tanto por vía intracerebral (Andreoletti et al., 2011; Cassmann et al., 2021; Okada et al., 2016; Simmons et al., 2007) como por vía oral (Simmons et al., 2011), lo que pone de manifiesto que es necesario seguir investigando y analizando los tejidos más críticos en la transmisión de otras enfermedades similares, como el scrapie clásico.

4.2. OBJETIVOS

El objetivo de este estudio es llevar a cabo estudios de infectividad de los tejidos más críticos en el caso del scrapie clásico, como son las placentas, para valorar su importancia en el caso del scrapie atípico Nor98.

4.3. MATERIAL Y MÉTODOS

4.3.1. Partos y recogida de placentas

Con el fin de estudiar la infectividad de las placentas de las ovejas infectadas con scrapie atípico se realizaron bioensayos en ratones modificados genéticamente. El modelo murino utilizado fue la línea transgénica Tg338, que sobreexpresa el alelo VRQ de la proteína prion ovina.

Para la obtención de tejido placentario, se procedió a la cubrición controlada, con machos, negativos a scrapie de raza Churra Tensina y genotipo AHQ/AHQ tras tratamiento hormonal para inducción y sincronización de celos, de las ovejas inoculadas por vía intracerebral con scrapie atípico. En todos los casos las placentas fuero obtenidas postparto.

Las placentas se recogieron del suelo de la cuadra entre 1 a 12 horas posteriores al parto, se retiró el exceso de paja y suciedad manualmente y se limpiaron con suero fisiológico. Después se procedió a diseccionar la placenta con unas pinzas y tijeras estériles, seleccionando para su recogida y estudio los cotiledones menos expuestos al ambiente exterior. Parte de estas muestras fueron recogidas en fresco y posteriormente almacenadas a -80ºC, para ser analizados mediante las técnicas de diagnóstico rápido y preparación de los inóculos y otra parte se sumergieron en formol tamponado al 10% para su fijación y su posterior examen mediante técnicas histopatológicas.

Se recogieron 6 placentas de 6 animales diferentes inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico entre 29 y 36 meses antes del parto. Estas ovejas en el momento del parto se encontraban en distintas fases de la enfermedad:

Tabla 12: Relación de placentas recogidas para bioensayo

PLACENTA	OVEJA	GENOTIPO	DÍAS INOC-PARTO	FASE CLÍNICA EN PARTO
1P	IC-06	AHQ/AHQ	1093	Terminal
2P	IC-07	AHQ/AHQ	1089	Terminal
3P	IC-10	AHQ/AHQ	884	Clínica
4P	IC-11	AHQ/AHQ	890	Clínica
5P	IC-12	ARR/AHQ	892	Preclínica
6P	IC-13	ARR/AHQ	905	Preclínica

4.3.2. Estudio de las placentas mediante técnicas rápidas e IHQ

A partir de las muestras recogidas en fresco y mantenidas en congelación se realizó la técnica ELISA de IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA. Se trata de una técnica de diagnóstico de scrapie admitida por el reglamento (CE) Nº 162/2009 de la Comisión Europea y que está puesta a punto para tejido nervioso y linfoide. La técnica se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 3).

Para la realización de la técnica se tomaron 0.35 g de los cotiledones y se trocearon con ayuda de un bisturí. Después se procedió a su introducción en un tubo suministrado por el kit y se

realizaron 3-4 ciclos de trituración en el Precess 48 (Bertin Technologies), dejando enfriar los homogenizados entre ciclos. Posteriormente, este homogeneizado se filtró con una gasa estéril para eliminar restos muy groseros o fibrosos del tejido que se habían triturado adecuadamente.

Además de los controles aportados por el kit, se añadieron como controles adicionales un trozo de cerebelo negativo y uno positivo a scrapie atípico, y una placenta positiva a scrapie clásico procedente del banco de tejidos del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

Para la técnica IHQ, los cotiledones se mantuvieron durante cinco días en formol para una correcta fijación, se tallaron realizando una sección transversal medial y se incluyeron en parafina siguiendo el protocolo histopatológico estándar. Posteriormente se realizaron cortes seriados de entre 3 y 5 micrómetros de grosor de cada muestra; uno de estos cortes se tiñó con hematoxilina–eosina para observar la estructura histológica y detectar posibles pigmentos que puedan generar confusión, y en otro se realizó la técnica de Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc}, usando el anticuerpo 8G8 formulado contra proteína PrP recombinante humana y que reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos 95 -108 (SQWNKP) en la proteína PrP. Este anticuerpo ha sido probado en numerosos experimentos como el que mejor reconoce la presencia de la proteína prion patológica en los casos de scrapie atípico (Andreoletti et al., 2011). Para la realización de esta técnica diagnóstica se siguió el protocolo de Monleón et al. (2003), que consiste en una serie de pretratamientos para el desenmascaramiento de epítopos con ácido fórmico, proteinasa K y autoclavado hidratado. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo monoclonal 8G8 a temperatura ambiente, durante una hora. El sistema de visualización y el cromógeno utilizados son EnVisionTM (DAKO, Denmark) y diaminobencidina (DAB), respectivamente (anexo 2).

4.3.3. Bioensayo de las placentas en modelo murino

A partir de los cotiledones recogidos y almacenados en congelación a -80ºC, se elaboraron inóculos para el análisis de su infectividad mediante bioensayo. Los inóculos se prepararon al 10% con suero fisiológico (peso/vol) y se complementó con 1.000 unidades/ml de penicilina y 1 mg/ml de estreptomicina (anexo 4).

Para la preparación de los inóculos se siguieron protocolos estrictos basados en el uso de equipos desechables y se realizaron en la cabina de bioseguridad de tipo 2.

Como ya se ha comentado, la línea murina utilizada fueron ratones Tg338. Esta línea, que fue desarrollada por H. Laude (Jouy-en-Josas, INRA Francia) (Laude et al., 2002), es transgénica para el alelo VRQ de la PrP ovina. Los ratones son homocigotos para el transgén, un inserto de cromosoma artificial bacteriano (BAC) compuesto por 125 kb de ADN ovino introducido en un fondo de PrP de ratón (Vilotte et al., 2001). El nivel de expresión de la PrP en su cerebro es de 8 a 10 veces superior al de las ovejas (Le Dur et al., 2005). Estos animales fueron proporcionados por O. Andrèoletti de ENVT-INRA (Toulouse, Francia) y posteriormente mantenidos y criados en nuestras instalaciones.

La inoculación se llevó a cabo en una cabina de bioseguridad tipo 2. Cada ratón se inoculó con 20 µl de un homogeneizado con tejido placentario al 10% usando una jeringuilla de precisión y una aguja 25G con un "tope" para no penetrar más de lo debido en el encéfalo y depositar el inóculo en corteza cerebral. Previamente a la inoculación el animal fue anestesiado y se le administró una analgesia adecuada.

Se utilizaron un total de 42 ratones, que fueron alojados en 7 grupos de 6 individuos conviviendo en la misma jaula e identificados individualmente mediante la colocación de un microchip por vía subcutánea.

En seis de esos grupos se realizó una inoculación intracerebral entre las 6 y las 12 semanas de vida de los animales con cada uno de los inóculos preparados a partir de las placentas (1P-6P), mientras que otro grupo de 6 animales se inoculó con suero fisiológico y se utilizó como control negativo.

Tras la inoculación, los ratones se mantuvieron en sus cubículos en los mismos grupos, con unas condiciones controladas de temperatura (22-23ºC) y humedad (55-60%) y con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno.

4.3.4. Mantenimiento de los ratones inoculados

Se realizó un seguimiento y valoración clínica de los ratones con una periodicidad de 3 veces a la semana, con el fin de determinar si se desarrollaba la enfermedad y, en ese caso, controlar la evolución de los signos clínicos, tales como cifosis, ataxia, opistótonos o pérdida de pelo, sacrificando al roedor cuando este llegara a un estadio terminal del proceso o bien cuando hubieran transcurrido más de 600 días tras la fecha de su inoculación, aunque no presentaran signos clínicos.

El sacrificio del animal se realizó por dislocación cervical e inmediatamente después se procedió a la extracción del encéfalo de la cavidad craneal. Un hemiencéfalo se conservó completo en formol y el otro se almacenó a -80ºC para su posterior análisis.

Estos procedimientos experimentales están autorizados y registrados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal, con el número PI19/14.

4.3.5. Detección de PrP^{Sc} mediante Pet Blot en los ratones inoculados

A partir de los tejidos obtenidos y fijados en formol, se realizó un estudio histopatológico del encéfalo, observando la posible presencia de lesiones, y determinando si en el tejido nervioso aparecían depósitos de proteína prion patológica mediante la técnica de Pet Blot.

El Pet-Blot se realizó según lo descrito por Schulz-Schaeffer y colaboradores en el año 2000, en muestras de cerebro de ratón. Se recogieron secciones cerebrales embebidas en parafina de 4 µm en una membrana de nitrocelulosa y se secaron a 37ºC durante 24 horas. A continuación, las membranas se sometieron a desparafinación y rehidratación y se incubaron durante 2 horas en una solución de proteinasa K (250 µg/ml) a 56ºC, para digerir completamente la PrP^{C}. La desnaturalización de la PrP^{res} restante se logró incubando las membranas en una solución de

tiocianato de guanidina 3M. Tras bloquear la membrana con BSA al 0,2% para evitar la reactividad cruzada, la detección se realizó mediante la incubación secuencial con el anticuerpo anti-PrP Sha31 (1:8000, SPI-Bio) y un anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina (AP) (1:500, Agilent Dako), seguido del revelado con NBT/BCIP (Thermo Scientific). A continuación, las membranas se lavaron y se secaron durante 24 horas a temperatura ambiente (Schulz-Schaeffer et al., 2000) (anexo 5).

4.3.6. Detección de PrP^{Sc} mediante Western Blot en los ratones inoculados

Con las muestras almacenadas en congelación se realizó un análisis bioquímico mediante transferencia de Western Blot a partir de un homogeneizado del encéfalo al 10%. Las muestras frescas se trataron con PK (50 µg / ml), se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas usando el protocolo de prueba Prionics AG Check® Western BSE. La inmunodetección se realizó usando anticuerpos monoclonales Sha31 (1 µg / ml) y 12B2 (4 µg / ml) (anexo 6).

4.3.7. Amplificación de PrP^{Sc} en el encéfalo de los ratones mediante PMCA

Con las muestras de encéfalo de los ratones inoculados con las placentas, también se realizó la técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas o PMCA, se trata de una técnica ultrasensible que ha demostrado gran efectividad en la detección de pequeñas cantidades de priones en distintas muestras. En esta técnica se produce una amplificación de la PrP^{Sc} *in vitro* mediante la incubación de una pequeña cantidad de esta con un exceso de PrP^{C}, seguida de ciclos alternos de sonicación e incubación; incrementándose de este modo la conversión de PrP^{C} en PrP^{Sc} (Brandel et al., 2019). Esto es posible porque la sonicación induce la fragmentación de las fibrillas insolubles de PrP^{Sc}, liberando, así, más oligómeros de PrP^{Sc} tóxicos capaces de inducir la conversión de más PrP^{C}, así como la generación de un mayor número de extremos libres a los cuales se podrán unir nuevos monómeros y formar nuevas fibrillas.

Para ello, se prepararon homogeneizados (10% en solución salina) con los encéfalos de los ratones de cada una de las jaulas. Posteriormente, cada homogeneizado se diluyó 1/50 para preparar las semillas de PMCA. Dichas semillas se sometieron a tres rondas (24 h cada una) de PMCA (Lacroux et al., 2012). En cada una de estas rondas se mezclaron 5 µl de semilla y 45 µl de sustrato por pocillo en una microplaca de PCR de 96 pocillos (AxygenScientific, EE. UU.). A cada pocillo se añadió una perla de teflón (2.381 mm de diámetro). La amplificación se realizó en un sonicador Qsonica Q700, utilizando un sistema de recirculación de agua. Luego, las microplacas se sometieron a 96 ciclos de sonicación de 10 s (75 % de potencia) seguidos de un período de incubación de 14 min y 50 s a una temperatura de 39,5 °C.

Después de cada ronda de PMCA (24h), se agregaron 5 µl del producto de reacción a una nueva microplaca que contenía 45 µl de sustrato fresco y se realizó una nueva ronda con 96 ciclos de sonicación e incubación. Como sustrato, se utilizó un homogeneizado de encéfalo de ratones Tg338, se trata de la misma línea que los ratones inoculados y son animales que sobreexpresan la PrP ovina, este homogeneizado se diluyó al 10% en buffer de PMCA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4,

5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100). Se utilizó sustrato sin semilla como control negativo y el control positivo se realizó con un homogeneizado de encéfalo de ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico y la cepa Dawson, una cepa estandarizada de scrapie clásico en ratón. Ambos controles diluidos desde la dilución 10^{-1} a la 10^{-8} (anexo 8).

La detección de la PrP^{Sc} después de la PMCA se realizó mediante Dot Blot, técnica cuantitativa de detección, análisis e identificación de proteínas en la cual la inmunodetección de proteínas se lleva a cabo mediante fijación por vacío en una membrana de nitrocelulosa sin haber sido separadas previamente por electroforesis.

Para la realización del Dot Blot, en primer lugar, se llevó a cabo la digestión y desnaturalización de las muestras amplificadas previamente mediante PMCA. A continuación, se realizó la transferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa, llevando a cabo la activación de dicha membrana y colocándola encima de un papel de filtro Whatman™ en un sistema de Dot Blot (Whatman® Minifold® I 96-well Spot-Blot Array System) conectado a una bomba de vacío. Con la bomba de vacío mantenida a 15-20 inHg de presión, se depositó en la membrana todo el volumen de cada muestra mezclada previamente con SDS al 1%. Seguidamente, se realizó la inmunodetección, bloqueando, en primer lugar, la membrana para incrementar la especificidad del Dot Blot, pues previene interacciones no específicas del anticuerpo con la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se incubó la membrana con una dilución 1/8000 del anticuerpo primario SHA31 y, posteriormente, con una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario HRP anti-mouse.

Por último, con el objetivo de visualizar la inmunodetección, se realizó el revelado vertiendo sobre toda la superficie de la membrana una mezcla de electroquimioluminiscencia (Amersham™ ECL) compuesta por 750 µl de luminol y 750 µl de peróxido (Cytiva), la cual se dejó actuar durante 5 min en oscuridad. Finalmente, se cubrió la membrana con otro papel film transparente y se visualizó con el sistema de análisis de imagen VersaDoc™ Imagen System (Bio-Rad) (anexo 9).

La confirmación de la detección de la PrP^{Sc} después de la PMCA, así como la obtención del perfil de glicosilación de los priones amplificados se realizó mediante Western Blot. Antes del Western Blot, se realizó un ensayo de proteína BCA (ácido bicincochínico) (23227, ThermoScientific™) para determinar la concentración de las muestras y en cada pocillo se cargaron cantidades iguales de proteína. La proporción relativa de las 3 bandas de PrP^{Sc} de los productos de PMCA resultantes y de los controles se determinó usando el software Image J (anexo 6).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Resultados del análisis por técnicas rápidas e IHQ de las placentas

La técnica de ELISA de IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA realizada con las muestras recogidas en fresco de las seis placentas obtenidas arrojó resultados negativos en todas ellas.

Los cortes de los cotiledones en los que se realizó la técnica de Inmunohistoquímica con el anticuerpo 8G8 fueron observados minuciosamente al microscopio óptico, pero no se encontró ninguna tinción compatible con la presencia de la proteína prion patológica. Únicamente se detectaron depósitos inespecíficos que al ser comparados con la tinción histológica básica de hematoxilina-eosina se comprobó que se trataba de depósitos de hemosiderina y de pigmento ceroide, ya descritos por Garza y colaboradores en 2012 (Tesis de Mª Carmen Garza).

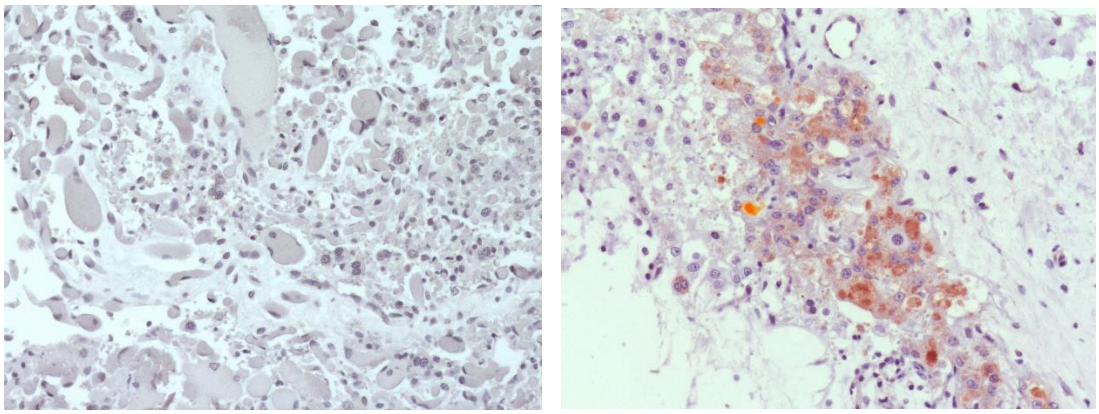


Figura 8. A. Foto de placenta en postparto, detección negativa de PrP^{Sc} por técnica IHQ (Ac 8G8), 20x. B Depósitos de pigmento ceroide y hemosiderina 20x en placenta.

4.4.2. Resultados del bioensayo

Los ratones inoculados con placentas de las ovejas objeto de estudio fueron sometidos a una intensa vigilancia encaminada a detectar cualquier cambio en su estado mental o signo neurológico. A pesar de ello, no se detectó ningún indicio de este tipo de síntomas en ninguno de ellos.

De los 36 ratones inoculados con los inóculos preparados a partir de las 6 placentas seleccionadas, 8 de ellos fueron encontrados muertos o sacrificados por presentar otras patologías entre los 10 y los 300 días tras la inoculación, estos animales fueron extraídos del estudio. El resto de los ratones fueron sacrificados con más de 550 días post inoculación por presentar problemas derivados del envejecimiento. A estos animales se les realizó la necropsia y extracción del encéfalo para su estudio. Todos los encéfalos fueron analizados con una de las dos técnicas de elección para este trabajo; Pet Blot o Western Blot.

Tabla 13. Resultados del estudio de los ratones inoculados con las placentas de ovejas con scrapie atípico.

JAULA	INÓCULO	FASE CLÍNICA	GENOTIPO	DPI	RESULTADO	MÉTODO
1P	IC-06	TERMINAL	AHQ/AHQ	690 ± 0	0/6	WESTERN BLOT
2P	IC-07	TERMINAL	AHQ/AHQ	648 ± 56	0/4	PET BLOT
3P	IC-10	CLÍNICA	AHQ/AHQ	625 ± 0	0/3	PET BLOT
4P	IC-11	CLÍNICA	AHQ/AHQ	615 ± 11	0/5	WESTERN BLOT
5P	IC-12	PRECLÍNICA	ARR/AHQ	616 ± 21	0/4	PET BLOT
6P	IC-13	PRECLÍNICA	ARR/AHQ	625 ± 0	0/5	WESTERN BLOT

En todos los casos el resultado del análisis de estos animales fue negativo, mientras que los controles utilizados para las dos técnicas sí que arrojaron resultados positivos.

Con los encéfalos de los ratones de las jaulas 2P, 3P y 6P se realizó la técnica de Pet Blot.

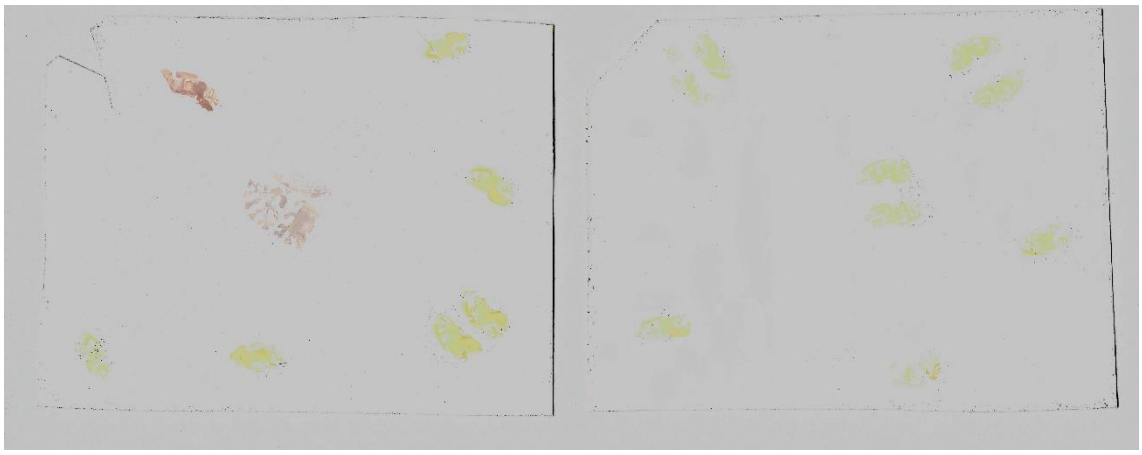


Figura 9. Resultados de la técnica de Pet Blot de 11 ratones Tg338 inoculados por vía intracerebral con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observa que todos los animales son negativos, excepto los controles positivos que corresponden con el cerebelo de una oveja infectada con scrapie atípico y el encéfalo de un ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico.

Con los encéfalos de los ratones de las jaulas 1P, 4P y 6P se realizó la técnica de Western Blot

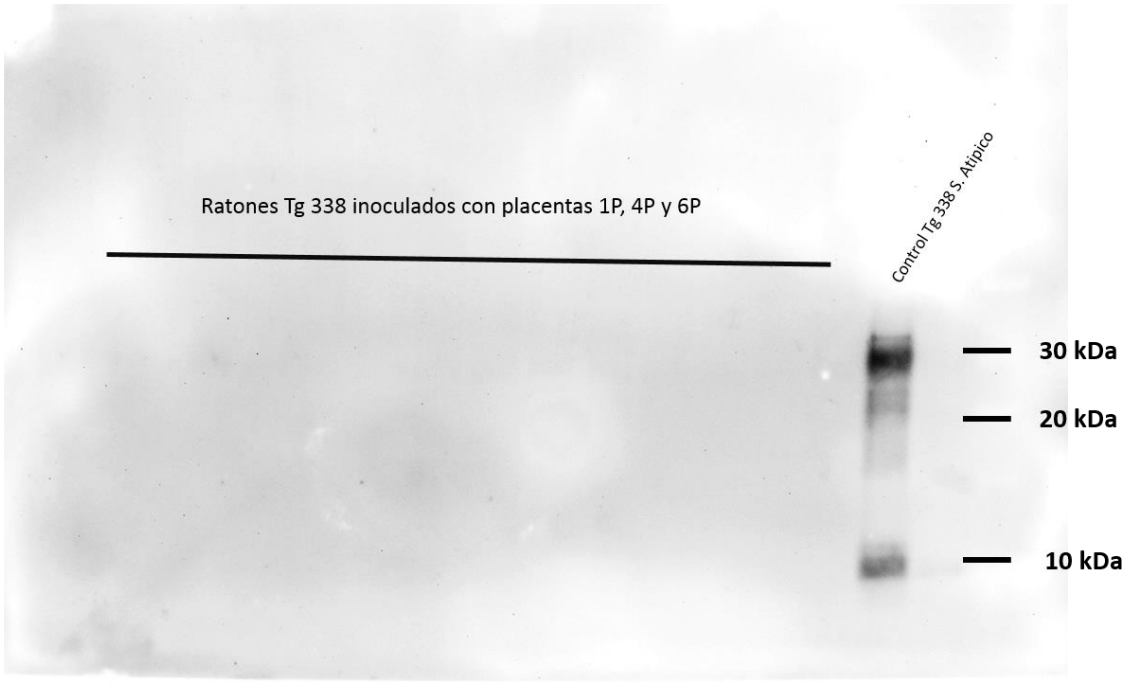


Figura 10. Resultados de la técnica de Western Blot de 16 ratones Tg338 inoculados por vía intracerebral con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observa que todos los animales son negativos, excepto el control positivo en el que se observan las bandas características del scrapie atípico y que se trata de un ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico.

Con el encéfalo de los ratones inoculados con las 6 placentas seleccionadas para el trabajo, se realizó la técnica ultrasensible PMCA, y la detección de la PrP^{Sc} presente en las muestras

resultantes, tras tres rondas de esta técnica, se analizó mediante Dot Blot. Los resultados esta técnica de mayor sensibilidad, detectaron positividad en todas las muestras. Cada una de las muestras se ensayó por cuadruplicado.

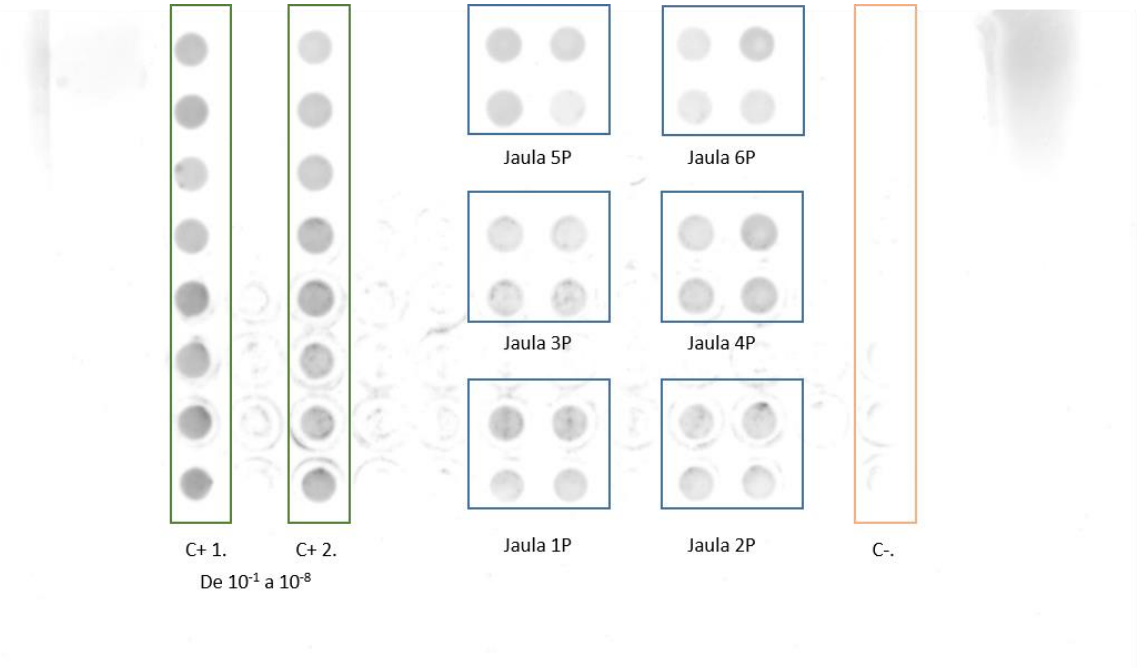


Figura 11. Resultados de Dot Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de los ratones inoculados con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observa inmunodetección en todos de los homogenizados de encéfalo de los ratones inoculados con las 6 placentas, así como en todas las diluciones de los dos controles. C+ 1 es la cepa Dawson, de scrapie clásico en ratón y C+ 2 es encéfalo de ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico. En el sustrato sin muestra utilizado como control negativo no se observa inmunodetección.

Tras la obtención de estos sorprendentes resultados, se realizó como técnica confirmatoria un Western Blot de los productos obtenidos tras la PMCA. Esta técnica nos ofreció idénticos resultados y además nos permitió conocer el perfil de glicosilación de los priones amplificados en la técnica de PMCA y este perfil resultó ser bioquímicamente idéntico al de los priones de scrapie clásico en todos los casos de ratones inoculados con placentas, así como en los dos controles positivos, a pesar de tratarse de inóculos de diferente origen.

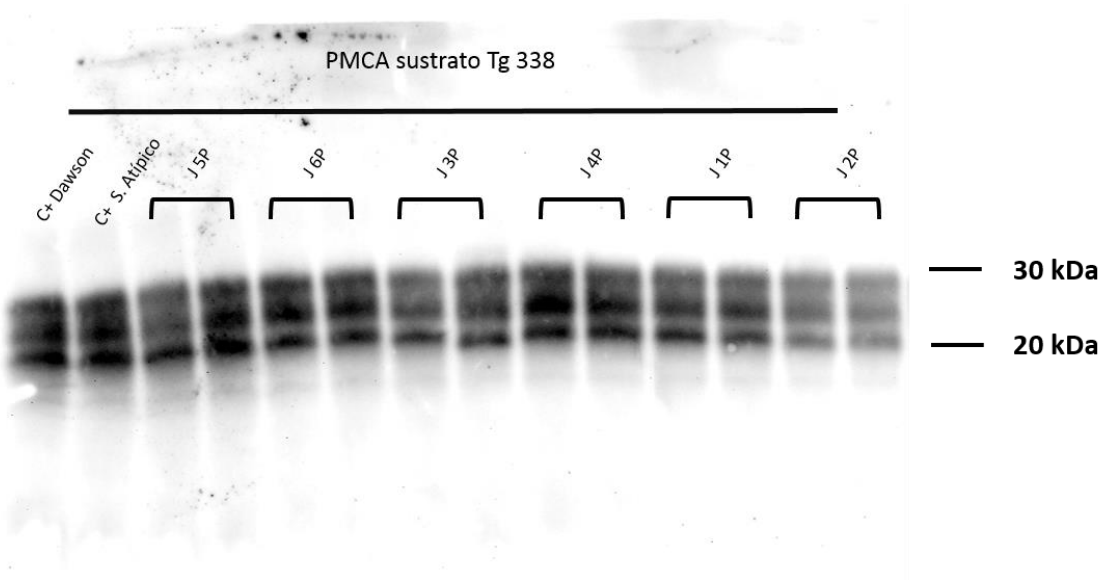


Figura 12. Resultados de Western Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de los ratones inoculados con placentas provenientes de ovejas infectadas con scrapie atípico. Se observan en todas las muestras las bandas de glicosilación características de scrapie clásico, así como en los dos controles, la cepa Dawson de scrapie clásico en ratón y encéfalo de ratón Tg338 inoculado con un aislado de scrapie atípico.

Cabe destacar que, el resultado es idéntico en los ratones inoculados con placentas obtenidas de ovejas que estaban en fase preclínica de la enfermedad en el momento del parto y de la obtención de la placenta, que en ratones inoculados con placentas de ovejas que estaban en fase clínica o terminal de la enfermedad en el momento del parto y obtención de este tejido.

4.5. DISCUSIÓN

A pesar de tratarse de placentas provenientes de animales positivos a scrapie atípico, no se detectó PrP^{Sc} en los cotiledones recogidos postparto por las técnicas de ELISA e IHQ. Se realizó por tanto un estudio de infectividad de estas placentas mediante bioensayo en modelo murino Tg338 que sobreexpresa el gen PrP ovino y los encéfalos de los ratones inoculados no mostraron presencia de priones cuando se analizaron con técnicas convencionales. Sin embargo, la técnica ultrasensible de amplificación de priones, PMCA, sí que demostró la presencia de priones en el encéfalo de estos animales, mostrando estos priones un perfil de glicosilación igual al del scrapie clásico.

Las técnicas de diagnóstico utilizadas con el tejido placentario fueron un kit de ELISA específico para la detección de la PrP^{Sc} y una IHQ con anticuerpos específicos, ambas son técnicas convencionales y poco sensibles, ya que no detectan cantidades pequeñas de PrP^{Sc}. Por este motivo se realizó un bioensayo en modelo murino con el objetivo de detectar infectividad, ya que otros estudios han arrojado resultados positivos, a pesar de la falta de detección por las técnicas anteriores (Andreoletti et al., 2011). Los encéfalos de estos ratones se analizaron con 2 técnicas convencionales diferentes y en las dos el resultado mostró la ausencia de la proteína

prion patológica en el encéfalo de los ratones y, por tanto, confirmaba la ausencia de esta proteína patológica en tejido placentario.

En estudios previos, que demostraron infectividad en ratones transgénicos ovinos de varios tejidos periféricos, entre ellos varios tejidos linfoides (Andreoletti et al., 2011), estos tejidos linfoides infectados podrían ser responsables de una diseminación de los priones a la placenta transportados por la linfa. El hecho de que en nuestro estudio no se detectara esa infectividad mediante técnicas poco sensibles podría ser debido a que ese transporte no se hubiera producido de manera eficaz o que la cantidad diseminada fuera muy pequeña y no se detectara.

Sin embargo, tras la realización de la técnica de amplificación de priones, PMCA, utilizando como sustrato ratones Tg338, que son animales que sobreexpresan la PrP ovina y que es la misma línea que los ratones inoculados, el resultado obtenido fue muy diferente, ya que todos los encéfalos murinos analizados mostraron amplificación de PrP^{Sc}. Estos priones amplificados se detectaron mediante la técnica de Dot Blot y, posteriormente, se realizó la técnica de Western Blot, para confirmar el resultado y obtener el perfil de glicosilación de los priones obtenidos, que coincidió con el perfil de glicosilación del scrapie clásico. Además, sorprendentemente, el control positivo utilizado, encéfalo de ratones inoculados con un aislado de scrapie atípico, arrojó idéntico resultado, priones con características bioquímicas idénticas a los obtenidos en el encéfalo de los ratones inoculados con las placentas y de los priones del scrapie clásico.

Estos resultados abren un amplio abanico de posibilidades, y nos plantea la duda de si los priones del scrapie clásico estaban presentes en el aislado original de scrapie atípico y en los aislados preparados con las placentas de las ovejas infectadas con scrapie atípico o si emergieron en el encéfalo de los ratones después de la inoculación. Al igual que otros estudios han descrito la presencia de niveles bajos de otras cepas priónicas, concretamente de C-EEB en aislados de scrapie atípico (Huor et al., 2019), se podría sospechar también que, en estos aislados de scrapie atípico, estuvieran presentes cierto número de confórmeros de scrapie clásico, en una cantidad limitada, que no permitiera ser detectado por técnicas convencionales, pero sí por técnicas ultrasensibles.

En el caso del scrapie clásico se sabe que la placenta es una ruta importante de excreción de priones al medio y responsable de la contaminación ambiental y de la transmisión horizontal de la enfermedad, en cambio la aparente ausencia de PrP^{Sc} y la aparente falta de infectividad de las placentas en scrapie atípico indicaría el bajo riesgo de transmisión natural asociado a este tejido y estaría en concordancia con lo hallado recientemente por Piel y colaboradores (Piel et al., 2022), aunque en ese caso se trataba de animales ARR/ARR, que ponían en evidencia, que el scrapie atípico se trataría de una enfermedad no transmisible en condiciones naturales, en la cual el agente etiológico estaría confinado al SNC (Moore et al., 2008).

Sin embargo, los hallazgos obtenidos tras la amplificación mediante PMCA, hacen imprescindible un estudio en mayor profundidad y ya se está llevando a cabo un segundo pase con los encéfalos de esos ratones mediante inoculación intracerebral a otros ratones de la misma extirpe, así como un nuevo análisis con técnicas ultrasensibles de las placentas recogidas de las ovejas

inoculadas intracerebralmente con scrapie atípico. Los resultados de este experimento, que está en proceso, nos permitirán determinar de manera más eficaz si la PrP^{Sc} se encuentra en las placentas de las ovejas infectadas con scrapie atípico, aunque sea en una mínima cantidad, y el riesgo que esto podría suponer para la contaminación del ambiente y para la transmisión entre animales.

5. ESTUDIO Nº 3. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DEL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO POR INFECCIÓN EXPERIMENTAL VÍA ORAL A LA ESPECIE OVINA.

5.1. INTRODUCCIÓN

Está ampliamente aceptado que, en varias enfermedades priónicas, la ingestión de material contaminado con el agente, es determinante para la adquisición de la enfermedad. Entre ellas podemos incluir el scrapie clásico en ovejas y cabras, la EEB (Wilesmith et al., 1988), el kuru (Lindenbaum, 2009), la vECJ en los seres humanos (Ghani et al., 2002) y en la encefalopatía transmisible del visón (Burger & Hartsough, 1965).

En el caso del scrapie clásico, la vía oral como fuente de infección ha sido estudiada en casos de infección experimental, y se ha comprobado que sigue un patrón similar a la vía natural (Heggebø et al., 2000). Cuando se realiza una infección experimental de una enfermedad priónica por vía oral hay varios factores que pueden influir en el éxito o fracaso de esta infección. Algunos son la edad, genotipo o estado inmunitario, que están asociados al individuo receptor, mientras que otros como la cepa, o el genotipo del individuo donante, dependen del agente infeccioso. Pero también son importantes factores relacionados con el propio diseño experimental, entre ellos, los más importantes serían la vía de infección y la dosis del inóculo.

Probablemente, en una infección natural de scrapie clásico, la edad es uno de los factores más determinantes, siendo el periodo neonatal la edad de mayor riesgo. Esto es debido al tipo de placenta que presentan los rumiantes, ya que estos animales nacen desprotegidos al no haber adquirido anticuerpos procedentes de la madre durante la gestación. Por este motivo, las primeras horas de vida son cruciales en la adquisición de inmunidad y esta la consiguen a través del calostro, del que captan las inmunoglobulinas maternas, además de factores de crecimiento. Para poder captar estas proteínas de gran tamaño la permeabilidad intestinal durante las primeras 48 horas de vida debe ser bastante elevada (Ano et al., 2008; Weström et al., 2020).

Otro motivo por el cual la susceptibilidad a la infección por scrapie es mayor en edades tempranas, es la mayor cantidad de tejido linfoide presente en el intestino de los animales jóvenes, concretamente en las placas de Peyer. Los rumiantes nacen con entre 25 y 50 placas de Peyer en yeyuno y solo una en el íleon, aunque de mayor tamaño, ya que puede medir hasta 3 metros. Esta placa de Peyer ileal va involucionando y reduciendo su tamaño hasta los 15-18 meses de edad, y esta reducción es la que disminuye el riesgo de infección en animales de mayor edad (St Rose et al., 2007; St Rose et al., 2006), ya que el tejido linfoide es clave para la replicación del prion.

Hay estudios en los que se ha demostrado que la dosis necesaria para inocular con éxito corderos de 24 horas de vida es bastante más baja que la dosis necesaria para infectar corderos de 4 meses de edad (Andréoletti et al., 2006; Hamir et al., 2009; Hamir et al., 2005).

Se han realizado numerosos estudios, probando diferentes dosis de inoculación, por diferentes vías y en animales de diferentes edades para tratar de reproducir la enfermedad de manera lo más parecido posible a la infección natural.

En estudios de inoculación oral, se ha probado dosis única o dosis múltiples, y administración en cavidad oral o sondando directamente a estómago. La dosis más baja con la que se ha

conseguido infectar corderos por vía oral con scrapie clásico hasta la fecha ha sido de 0,1 gramos de tejido encefálico de una oveja afectada de scrapie clásico, consiguiendo una tasa el 100% en animales de genotipo ARQ/ARQ, sin embargo, en animales ARR/ARQ de la misma edad y con la misma cantidad de inóculo no resultó infectado ningún animal (Greenlee et al., 2016).

En otro estudio, se probaron dos dosis diferentes de scrapie clásico, de 1 gramo y 5 gramos respetivamente, en corderos de 2 semanas de edad y genotipo sensible y no hubo diferencias en la tasa de infectividad, ni en el periodo de incubación entre ambas dosis, lo que parece indicar que una vez que se alcanza la dosis mínima umbral necesaria para que los animales se infecten no hay diferencias, aunque se utilicen dosis claramente mayores (González et al., 2014; Ryder et al., 2009).

Sin embargo, en el caso del scrapie atípico la transmisión oral natural no ha sido demostrada y todo apunta a que se trata de una enfermedad infecciosa pero no contagiosa, que aparece de manera espontánea. Estudios previos de infección experimental intracerebral de scrapie atípico a ovejas, así como en los resultados obtenidos en experimentos anteriores de esta tesis, demuestran que la enfermedad se puede reproducir con éxito en animales de diferentes genotipos, como AHQ/AHQ, ARR/AHQ, ARQ/ARQ o ARR/ARQ (Andreoletti et al., 2011; Cassmann et al., 2021; Okada et al., 2016; Simmons et al., 2007), pero siempre por inoculación intracerebral.

Respecto a la infección experimental del scrapie atípico utilizando la vía oral, hay pocos experimentos al respecto. En un estudio realizado por Simmons y colaboradores en 2011, se realizó una infección experimental por vía oral en 12 corderos con genotipos AHQ/AHQ y ARR/ARR, a cada uno de los animales se les administró 2 dosis conteniendo cada una de ellas 2,5 gramos de homogeneizado de encéfalo de un animal con scrapie atípico natural. La primera dosis se les administró con 1 día de vida y la segunda con 15 días de vida. La mitad de los animales fueron eutanasiados a los 12 meses sin mostrar signos clínicos y no se encontró presencia de PrP^{Sc} en los tejidos examinados por técnicas convencionales de diagnóstico. El resto de los animales fueron eutanasiados a los 24 meses, cuando solo uno de ellos mostraba signos clínicos claros y compatibles con una EET, y en el análisis de los tejidos postmorten se detectó PrP^{Sc} en dos de estos animales, ambos homocigotos para el alelo AHQ siendo sus perfiles de WB compatibles con scrapie atípico. Este depósito solo se localizó en el SNC, resultando negativos el resto de tejidos analizados (Simmons et al., 2011).

En este estudio se logró una transmisión por vía oral exitosa del scrapie atípico en animales de genotipo AHQ/AHQ, aunque con una tasa de efectividad baja. Todo esto pone de manifiesto que es necesario seguir investigando y analizando la posibilidad de que se produjera este tipo de transmisión en condiciones naturales.

Sin embargo, esto no indica susceptibilidad por vía oral y la posibilidad de transmisión en condiciones naturales del scrapie atípico sería por tanto insignificante.

5.2. OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es estudiar la infectividad y el comportamiento de un aislado priónico de scrapie atípico de origen en Cataluña (CReSA), administrado por vía oral en ovinos de distintos genotipos, con el fin de estudiar la posibilidad de que se produjera una infección en animales expuestos a dicho agente en condiciones naturales de granja.

5.3. MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1. Selección de animales y procedimiento experimental

Para este estudio fueron utilizados un total de trece animales de la especie ovina, todos ellos fueron hembras de la raza churra tensina. Estos animales fueron adquiridos en un rebaño experimental perteneciente al Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) y situado en La Finca "La Garcipollera" en Bescós de la Garcipollera (Huesca).

El genotipo de estos animales para el gen *PRNP* fue AHQ/AHQ en 5 de los animales y AHQ/ARR en los 8 animales restantes (tabla 14).

A su llegada al animalario del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, los animales se desparasitaron y vacunaron frente a enterotoxemia y se les realizó una valoración clínica inicial para constatar su buen estado de salud y la ausencia de signos clínicos de ninguna enfermedad. A su llegada, los animales tenían entre 2 y 3 meses de edad.

Tabla 14. Relación de ovejas inoculadas vía oral con scrapie atípico.

IDENTIFICACIÓN	GENOTIPO	F. NACIMIENTO	F. INOCULACIÓN	DÍAS A LA INOC
O-1	AHQ/AHQ	14/03/2010	13/07/2010	121
O-2	AHQ/AHQ	10/03/2010	13/07/2010	125
O-3	AHQ/AHQ	12/03/2010	13/07/2010	123
O-4	AHQ/AHQ	19/03/2010	13/07/2010	116
O-5	AHQ/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	115
O-6	ARR/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	115
O-7	ARR/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	115
O-8	ARR/AHQ	17/03/2010	13/07/2010	118
O-9	ARR/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	115
O-10	ARR/AHQ	19/03/2010	13/07/2010	116
O-11	ARR/AHQ	22/03/2010	13/07/2010	113
O-12	ARR/AHQ	27/03/2010	13/07/2010	108
O-13	ARR/AHQ	09/04/2010	13/07/2010	95

Un mes después de su llegada, se inocularon por vía oral. El inóculo utilizado fue TOA3, realizado a partir de un homogeneizado de tejido encefálico de una oveja 18 meses de edad y genotipo ARQ/ARQ, que presentaba scrapie atípico. Este inóculo fue preparado y suministrado por el grupo de investigación en enfermedades priónicas del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA) de Barcelona.

El inóculo estaba preparado con tejido encefálico diluido al 10% con suero fisiológico estéril. Cada uno de los animales recibió 15 mililitros de estos inóculos que se corresponde con 1,5 gr de tejido encefálico.

Para proceder a la inoculación se inmovilizó al animal en posición sentado sobre sus extremidades posteriores con la cabeza hacia arriba y con la columna vertebral bien alineada. Después se introdujo la sonda por la boca previamente humedecida y se fue introduciendo con suavidad hasta la mitad del esófago. Después se introdujo con ayuda de una jeringuilla desechable los 15 ml del inóculo por la sonda. Inmediatamente después se introdujo otra jeringuilla con 50 ml de suero fisiológico estéril para asegurar que todo el inóculo se depositaba en esófago y no quedaban restos en la sonda. Tras la inoculación se retiró la sonda despacio y se verificó que no quedaba contenido en la misma. Todos los animales inoculados fueron vigilados durante los siguientes minutos para comprobar que no se produjera ninguna regurgitación.

Los animales no fueron sometidos a ningún tipo de ayuno, ni antes ni después de la inoculación.

Todos los procedimientos realizados con los animales fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza con los códigos PI 13/10 y PI 04/17. El cuidado y uso de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal recogida en el RD 53/2013, que cumple con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

5.3.2. Vigilancia y valoración clínica de los animales.

Tras la infección experimental se realizaron observaciones, con una periodicidad semanal, en las que se valoraba fundamentalmente la condición corporal y el comportamiento del animal.

Una vez al mes se realizó una monitorización clínica enfocada a detectar cualquier signo clínico que pudiera estar relacionado con el padecimiento de una encefalopatía. En estas evaluaciones clínicas completas se valoraba el estado mental del animal, evaluando la posible presencia de hiperexcitabilidad, apatía o depresión. También se evaluaban las posibles alteraciones a nivel locomotor, principalmente ataxia, incoordinación o hipermetría, estas pruebas se realizaban primero tapando los ojos del animal, ya que es como se detectan la aparición de los primeros signos clínicos. También se realizaban pruebas de reflejos espinales, de los nervios craneales y la evaluación del sistema músculo esquelético (movimientos de extensión, flexión y lateralización de las extremidades). También se observaba si el animal tenía prurito y se

realizaba la prueba de rascado con estímulos en las áreas: cervical, torácica dorsal, lumbar, sacra y caudal.

Mensualmente se realizó una toma de muestras de sangre de los animales inoculados, para ser procesada y separada en plasma, suero y sangre entera.

5.3.3. Recogida de muestras y tejidos de los animales

Todos los animales fueron eutanasiados entre los 1347 y 3810 días postinoculación, a pesar de no presentar signos compatibles con una enfermedad priónica. Algunos de los animales fueron sacrificados de forma electiva por valorar si existía positividad en algún tejido, otros por presentar otras patologías y los últimos por presentar una edad superior a la esperanza de vida de esta especie en condiciones naturales de granja. La eutanasia se realizó mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (tabla 15).

Tabla 15. Relación de animales inoculados por vía oral con scrapie atípico con fecha de eutanasia. dpi (días postinoculación), api (años postinoculación).

IDENTIFICACIÓN	GENOTIPO	F. NAC	F. INOC	F. SACRIF	dpi	api
O-1	AHQ/AHQ	14/03/2010	13/07/2010	14/07/2016	2193	6,01
O-2	AHQ/AHQ	10/03/2010	13/07/2010	25/11/2019	3422	9,38
O-3	AHQ/AHQ	12/03/2010	13/07/2010	28/11/2014	1599	4,38
O-4	AHQ/AHQ	19/03/2010	13/07/2010	08/02/2019	3132	8,58
O-5	AHQ/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	17/12/2020	3810	10,44
O-6	ARR/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	08/02/2019	3132	8,58
O-7	ARR/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	24/03/2021	3907	10,70
O-8	ARR/AHQ	17/03/2010	13/07/2010	19/07/2016	2198	6,02
O-9	ARR/AHQ	20/03/2010	13/07/2010	21/03/2014	1347	3,69
O-10	ARR/AHQ	19/03/2010	13/07/2010	17/12/2020	3810	10,44
O-11	ARR/AHQ	22/03/2010	13/07/2010	25/11/2019	3422	9,38
O-12	ARR/AHQ	27/03/2010	13/07/2010	14/12/2018	3076	8,43
O-13	ARR/AHQ	09/04/2010	13/07/2010	14/12/2018	3076	8,43

Previamente a la eutanasia se realizó una toma de muestras de sangre, con el fin de obtener, suero, plasma, sangre entera y células blancas de la sangre.

Inmediatamente después de la eutanasia se realizó una necropsia completa y sistemática del animal en la que se recogieron muestras de los siguientes órganos y tejidos por duplicado:

SNC: Corteza frontal, núcleos basales, tálamo, hipotálamo, corteza occipital, hipocampo, mesencéfalo, puente, cerebelo, médula oblonga, medula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar.

SNP: Ganglio del trigémino, nervio braquial, nervio ciático, ojo y músculos exoculares.

SLR: Linfonodos mediastínico, mesentérico, retrofaríngeo, submandibular, preescapular, precural, poplíteo e iliaco; bazo, placas de Peyer, tercer párpado y amígdalas.

TGI: lengua, esófago, rumen, retículo, omaso, abomaso, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto.

Otros órganos: Pulmón, corazón, hígado, páncreas, músculos tríceps braquial y bíceps femoral, piel de la extremidad posterior a nivel del muslo, riñón, glándula adrenal, vejiga, útero, ovarios y glándula mamaria.

Una de las muestras se guardó en formol tamponado al 10% para el estudio histopatológico e Inmunohistoquímico y la otra se congelo a -80ºC para realizar la técnica de diagnóstico rápido de scrapie ELISA con el kit comercial HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA de la casa comercial IDEXX.

5.3.4. Estudio inmunohistoquímico de las muestras

Las muestras recogidas en formol, se mantuvieron durante cinco días para una correcta fijación y posteriormente se tallaron e incluyeron en parafina siguiendo un procedimiento histopatológico estándar. A partir de cada una de estas muestras se realizaron cortes seriados de entre 3 y 5 micrómetros de grosor (anexo 1).

Uno de los cortes se procesó mediante la técnica de Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc}, usando el anticuerpo 8G8 formulado contra proteína PrP recombinante humana y que reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos 95 -108 (SQWNKP) en la proteína PrP. Este anticuerpo ha sido probado en numerosos experimentos como el que mejor reconoce la presencia de la proteína prion patológica en los casos de scrapie atípico (Andreoletti et al., 2011). Para la realización de esta técnica diagnóstica se siguió el protocolo de Monleón et al. (2003), que consiste en una serie de pretratamientos para el desenmascaramiento de epítopos con ácido fórmico, proteinasa K y autoclavado hidratado. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo monoclonal 8G8 a temperatura ambiente, durante una hora. El sistema de visualización y el cromógeno utilizados son EnVisionTM (DAKO, Denmark) y diaminobencidina (DAB), respectivamente (anexo 2).

Se intentó realizar un perfil inmunohistoquímico valorando la presencia, intensidad y tipo de depósito en una serie de áreas de diferentes secciones del encéfalo del animal: médula espinal cervical, médula oblonga, cerebelo, puente, mesencéfalo, tálamo, núcleos basales y corteza cerebral (Figura X) y proporcionando un valor a cada tipo de depósito, en cada área observada, entre 0 (ausencia de depósito) a 3 (gran magnitud de depósito). Para ello se usó de referencia las mismas áreas y los mismos núcleos valorados en el capítulo anterior (figura 3).

También se realizó la técnica de inmunohistoquímica para detectar posible presencia de la proteína prion patológica en el resto de tejidos y órganos recogidos durante la necropsia: SNP, SLR, TGI y otros órganos.

5.3.5. Detección de la PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA

Se realizó la técnica ELISA con parte de las muestras recogidas en la necropsia de los animales eutanasiados. Se realizó esta técnica con el obex y el cerebelo de cada uno de los animales del estudio, como zonas diana del scrapie para valorar la presencia deinfección. El kit utilizado fue el HerdChek BSE-Scrapie Antigen EIA (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA), de la casa comercial IDEXX. Para su realización se siguieron las instrucciones del fabricante. Previamente a su análisis, las muestras se descongelaron a 4ºC durante toda una noche. De cada muestra se tomaron 0.35 g para su trituración en un tubo suministrado por el kit y se realizó 1 ciclo de trituración en el Precess 48 (Bertin Technologies) (anexo 3).

5.3.6. Amplificación de PrP^{Sc} en el encéfalo de las ovejas mediante PMCA

Con las muestras de encéfalo de tres ovejas de cada genotipo, se realizó la técnica de amplificación cíclica de proteínas mal plegadas o PMCA, se eligieron algunos de los animales que habían permanecido más tiempo con vida tras la inoculación, para aumentar las posibilidades de detectar la PrP^{Sc} en alguno de ellos. Las ovejas seleccionadas fueron: O-02, O-04, O-05, O-07, O-10 y O-11.

Como ya se ha comentado en el capítulo anterior, La PMCA es una técnica ultrasensible que ha demostrado gran efectividad en la detección de cantidades pequeñas de priones presentes en distintas muestras.

Para ello, se prepararon homogeneizados (10% en solución salina) con los encéfalos de las citadas ovejas. Posteriormente, cada homogeneizado se diluyó 1/50 para preparar las semillas de PMCA. Dichas semillas se sometieron a tres rondas (24 h cada una) de PMCA (Lacroux et al., 2012). En cada una de estas rondas se mezclaron 5 µl de semilla y 45 µl de sustrato por pocillo en una microplaca de PCR de 96 pocillos (AxygenScientific, EE. UU.). A cada pocillo se añadió una perla de teflón (2.381 mm de diámetro). La amplificación se realizó en un sonicador Qsonica Q700, utilizando un sistema de recirculación de agua. Luego, las microplacas se sometieron a 96 ciclos de sonicación de 10 s (75 % de potencia) seguidos de un período de incubación de 14 min y 50 s a una temperatura de 39,5 °C.

Después de cada ronda de PMCA (24h), se agregaron 5 µl del producto de reacción a una nueva microplaca que contenía 45 µl de sustrato fresco y se realizó una nueva ronda con 96 ciclos de sonicación e incubación.

Para la realización de la técnica se emplearon dos sustratos diferentes, se utilizó un homogeneizado de encéfalo de ratones TgShp XI, que sobreexpresan la variante ARQ/ARQ de la PrP ovina, y también homogeneizado de encéfalos de ratones transgénicos TgBov que sobreexpresan PrP bovina (Castilla et al., 2003), en este caso se complementó con 0,25% p/vol de dextrano de bajo peso molecular. Se utilizaron ambos sustratos sin semilla como controles

negativos, y como controles positivos, un homogeneizado de óbex de oveja afectada con scrapie clásico y un homogeneizado de cerebelo de oveja afectada con scrapie atípico. Ambos controles diluidos desde la dilución 10^{-1} a la 10^{-8} (anexo 8).

La detección de la PrP^{Sc} después de la PMCA se realizó mediante Dot Blot, técnica cuantitativa de detección, análisis e identificación de proteínas, en la cual la inmunodetección de proteínas se lleva a cabo mediante fijación por vacío en una membrana de nitrocelulosa sin haber sido separadas previamente por electroforesis.

Para la realización del Dot Blot, en primer lugar, se llevó a cabo la digestión y desnaturalización de las muestras amplificadas previamente mediante PMCA. A continuación, se realizó la transferencia de las muestras a la membrana de nitrocelulosa, llevando a cabo la activación de dicha membrana y colocándola encima de un papel de filtro Whatman™ en un sistema de Dot Blot (Whatman® Minifold® I 96-well Spot-Blot Array System) conectado a una bomba de vacío. Con la bomba de vacío mantenida a 15-20 inHg de presión, se depositó en la membrana todo el volumen de cada muestra mezclada previamente con SDS al 1%. Seguidamente, se realizó la inmunodetección, bloqueando, en primer lugar, la membrana para incrementar la especificidad del Dot Blot, pues previene interacciones no específicas del anticuerpo con la membrana de nitrocelulosa. Posteriormente, se incubó la membrana con una dilución 1/8000 del anticuerpo primario SHA31 y, posteriormente, con una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario HRP anti-mouse.

Por último, con el objetivo de visualizar la inmunodetección, se realizó el revelado vertiendo sobre toda la superficie de la membrana una mezcla de electroquimioluminiscencia (Amersham™ ECL) compuesta por 750 µl de luminol y 750 µl de peróxido (Cytiva), la cual se dejó actuar durante 5 min en oscuridad. Finalmente, se cubrió la membrana con otro papel film transparente y se visualizó con el sistema de análisis de imagen VersaDoc™ Imagen System (Bio-Rad) (anexo 9).

La confirmación de la detección de la PrP^{Sc} después de la PMCA, así como la obtención del perfil de glicosilación de los priones amplificados, se realizó mediante Western Blot. Antes del Western Blot, se realizó un ensayo de proteína BCA (ácido bicincochínico) (23227, ThermoScientific™), para determinar la concentración de las muestras, y en cada pocillo se cargaron cantidades iguales de proteína. La proporción relativa de las 3 bandas de PrP^{Sc} de los productos de PMCA resultantes y de los controles se determinó usando el software Image J (anexo 6).

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Resultados de la vigilancia y valoración clínica de los animales

Las observaciones periódicas realizadas a los trece animales sometidos a inoculación oral con scrapie atípico no revelaron en ningún momento signos clínicos neurológicos compatibles con el padecimiento de una EET ni con otra enfermedad del sistema nervioso. Ninguno de ellos

arrojó un resultado positivo a los test neurológicos realizados y tampoco presentaban signos clínicos neurológicos en el momento de la eutanasia.

A pesar de eso, se fueron eutanasiando de forma electiva periódicamente, para valorar si la enfermedad estaba presente de manera subclínica. Alguno de los animales presentó alguna patología concomitante y fueron eutanasiados cuando su bienestar se vio comprometido. Se presentaron dos ovejas con patología respiratoria, que se sacrificaron a los cuatro y ocho años postinoculación respectivamente, y otras dos con adelgazamiento evidente debido a problemas de dentición, relacionados con su avanzada edad, ya que se sacrificaron a los 8 años postinoculación. Los últimos animales se sacrificaron con más de diez años de vida, y más de diez años postinoculación, porque se consideró que ya habían superado la expectativa de vida de las ovejas domésticas, que según algunos estudios está en torno a los 7,1 años, aunque algún animal especialmente longevo y no sometido a condiciones de productividad alta podría alcanzar los 12 años de vida (Chen et al., 2009).

5.4.2. Resultados de la búsqueda de PrP^{Sc} mediante ELISA e IHQ

El resultado de esta técnica rápida de diagnóstico realizado con las muestras de cerebelo y óbex, fue negativo para todas las ovejas y no se consideró por tanto necesario realizar esta técnica en el resto de las muestras recogidas.

En el estudio IHQ de las muestras procedentes del SNC de las ovejas inoculadas, se valoró la presencia de depósitos de PrP^{Sc} mediante un análisis subjetivo de los distintos cortes, a través del microscopio óptico. Sin embargo, en ninguna de las muestras estudias se detectó evidencia de esta presencia de depósitos.

También se realizó una búsqueda en el SNP y en el resto de órganos y tejidos recogidos de los animales con resultado igualmente negativo. Algunos estudios han sugerido que, tras la infección oral, los tejidos linfoides asociados a la faringe podrían acumular proteína prion (González et al., 2014). No obstante, en nuestro estudio el inóculo se depositó directamente en esófago con ayuda de una sonda esofágica, por lo que no existió contacto del material infeccioso con la región faríngea, sino que la zona de tejido linfoide en la que se pudo establecer ese primer contacto fue la placa de Peyer ileal, que la mayoría de los investigadores encuentran como el primer sitio de detección de PrP^{Sc} en el scrapie clásico. En el examen de las muestras ambas zonas fueron objeto de estudio minucioso.

5.4.3. Resultados de la amplificación de PrP^{Sc} mediante PMCA

Con el encéfalo de seis de las ovejas inoculadas por vía oral con scrapie atípico, se realizó la técnica ultrasensible PMCA, ya que es una técnica de alta sensibilidad, capaz de detectar pequeñas cantidades de PrP^{Sc}. Se seleccionaros tres ovejas de cada genotipo, eligiéndose las que habían permanecido con vida durante más tiempo tras la inoculación. La detección de la PrP^{Sc} presente en las muestras resultantes, tras tres rondas de esta técnica, se analizó mediante Dot Blot. Tras esta técnica de diagnóstico, solo se observó inmunodetección en una de las muestras, la que se correspondía con la oveja O-02. Esta amplificación de priones solo se produjo a partir

del sustrato de ratones transgénicos TgBov que sobreexpresan PrP bovina, mientras que a partir del sustrato de ratones TgShp XI, que sobreexpresan la variante ARQ/ARQ de la PrP ovina, ni esta oveja, ni ninguna de las demás, dio lugar a esa amplificación, considerándose, por tanto, el resto de los resultados negativos.

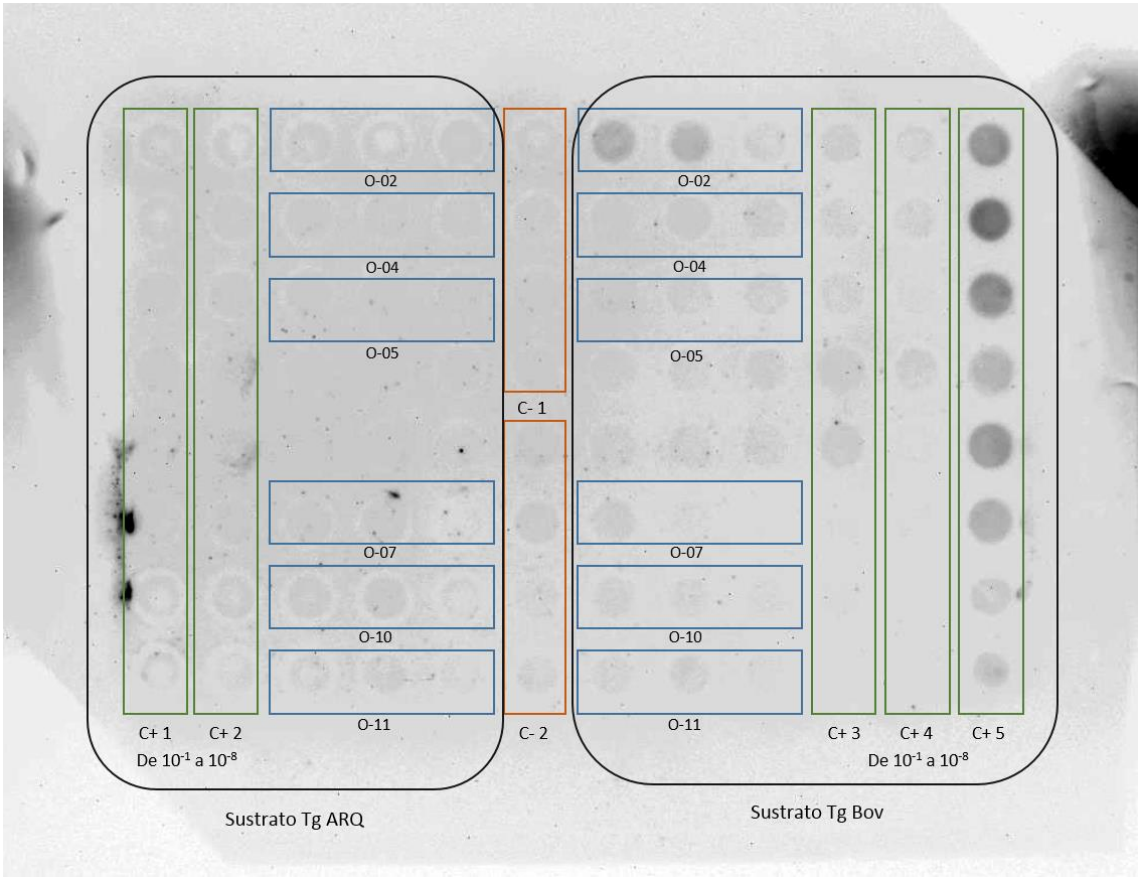


Figura 13. Técnica Dot Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de las ovejas inoculadas vía oral con scrapie atípico. Solo se observa inmunodetección en dos de los tres homogenizados de encéfalo de la oveja O-02 con sustrato TgBov. Ese mismo animal utilizando sustrato TgARQ, así como el resto de ovejas inoculadas con scrapie atípico por vía oral arrojan resultado negativo. El C- 1, control negativo utilizando solo sustrato de TgARQ sin muestra y el C- 2, control negativo, utilizando sustrato TgBov sin muestra, no muestran amplificación. En la técnica se utilizaros 5 controles positivos, todos diluidos desde la dilución 10^{-1} a la 10^{-8}. C+ 1, homogeneizado de scrapie clásico en sustrato TgARQ. C+ 2, homogeneizado de scrapie atípico en sustrato TgARQ. C+ 3, homogeneizado de scrapie clásico en sustrato TgBov. C+ 4, homogeneizado de scrapie atípico en sustrato TgBov. C+ 5, homogeneizado de EEB en sustrato TgBov. Solo se detecta inmunodetección en el C+ 5, hasta la dilución 10^{-6}.

Para confirmar estos resultados y conocer el perfil de glicosilación de los priones amplificados tras la PMCA, se realizó un Western Blot, con las muestras que habían resultado positivas al Dot Blot, los dos homogeneizados de la oveja O-02. Como controles positivos se analizó la dilución 10^{-1} del homogeneizado de EEB y la dilución 10^{-1} del homogeneizado de la cepa Dawson de scrapie clásico en ratón. El Western Blot mostró la presencia de priones en estas muestras, y, curiosamente, con un perfil de glicosilación bioquímicamente idéntico al de la EEB.

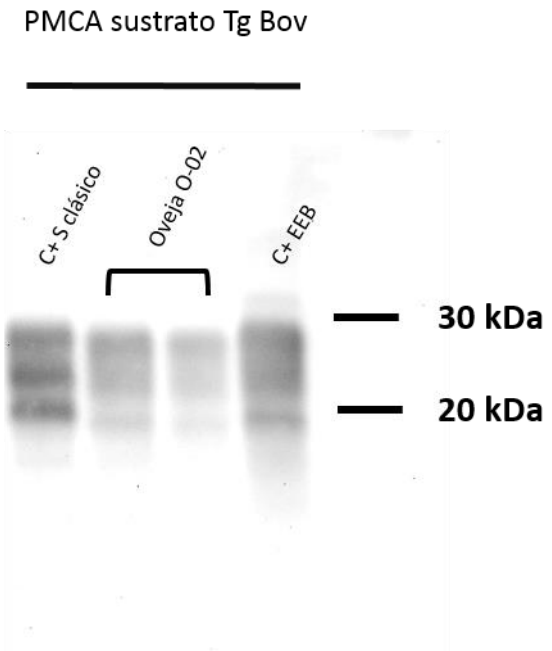


Figura 14. Resultados de Western Blot de los productos de PMCA de los encéfalos de las ovejas inoculadas por vía oral con scrapie atípico. Se observan en las dos muestras de la oveja O-02 las bandas de glicosilación características de EEB, así como en el control de EEB, la cepa Dawson de scrapie clásico en ratón muestra las bandas de glicosilación características de scrapie clásico.

5.5. DISCUSIÓN

En este estudio, los 13 animales inoculados por vía oral con scrapie atípico, de dos genotipos diferentes AHQ/AHQ y ARR/AHQ, se mantuvieron asintomáticos hasta el momento de la eutanasia, realizada entre los 3,7 y los 10,7 años tras la infección experimental. Las muestras recogidas, de SNC y de otros tejidos, fueron analizadas mediante IHQ y test ELISA obteniéndose resultados negativos en ambas técnicas de diagnóstico.

Debido a que las técnicas de diagnóstico utilizadas son técnicas convencionales y poco sensibles, se realizó la técnica ultrasensible de amplificación de priones PMCA. En este caso el resultado fue un poco diferente, ya que la muestra de uno de los animales, mostró una amplificación de priones cuando se sembró con sustrato de ratones TgBov, que amplifican la PrP bovina. Asimismo, mediante Western Blot, se mostró que los priones amplificados en esas muestras tenían un perfil de glicosilación igual al de la EEB. Este sorprendente resultado, nos lleva a plantearnos la posibilidad de que, si estos animales hubieran desarrollado la enfermedad, esta hubiera sido bioquímicamente más parecida a la EEB que al scrapie atípico, y las consecuencias que esto podría tener en el marco de la salud pública. Esta posibilidad vendría avalada por el estudio en el que se señala al scrapie atípico como el posible origen de la EEB (Huor et al., 2019).

Se conoce la posibilidad de transmisión del agente del scrapie atípico ovino por vía intracerebral en animales de genotipo AHQ/AHQ (Simmons et al., 2007; Simmons et al., 2010), ARQ/ARQ (Okada et al., 2016), ARQ/ARR, VRQ/ARQ (Cassmann et al., 2021), ARR/ARR (Piel et al., 2022) y

ARR/AHQ (estudios en proceso de publicación). En estos estudios, únicamente mostraron signos clínicos los animales de genotipos AHQ/AHQ, ARR/ARQ y ARR/AHQ, a pesar de haberse mantenido los animales con vida hasta los 7 u 8 años tras la infección experimental.

También es conocido que la transmisión intracerebral exitosa de un agente particular de EET no necesariamente indica susceptibilidad por vía oral (Matthews & Cooke, 2003).

Respecto a los estudios de transmisión oral del agente del scrapie atípico, aunque existen pocos trabajos, uno de ellos se demostró la capacidad de producir la enfermedad por vía oral a ovejas AHQ/AHQ, aunque utilizando dosis más altas y animales de menor edad que los ensayados en nuestro experimento (Simmons et al., 2011).

La vía oral es la que se parece más a la transmisión natural y se considera actualmente como la mejor vía para imitar la contaminación natural de EET en los rumiantes, por ese motivo se decidió utilizar esta vía utilizándose el mismo inóculo que el utilizado en la vía intracerebral, así como la misma raza de ovejas pertenecientes a los mismos genotipos. Esta administración del prion por vía oral se considera la alternativa al estudio de esta enfermedad adquirida por vía natural, ya que las posibilidades de este estudio son limitadas, porque se requieren rebaños con alta incidencia de la enfermedad y existen numerosas limitaciones.

En los pequeños rumiantes, la inoculación oral de EET generalmente se realiza mediante la administración de una o dos dosis infecciosas masivas (comúnmente 5 g de material encefálico) (Andréoletti et al., 2004; Bellworthy et al., 2005; Foster et al., 2001). Mientras que, en condiciones de exposición natural, la contaminación con scrapie clásico ocurre principalmente alrededor del nacimiento (Detwiler & Baylis, 2003), a partir de numerosas fuentes potenciales de contaminación, como anexos fetales (Andréoletti et al., 2002), calostro, leche (Konold et al., 2008; Lacroux et al., 2008) o incluso el entorno. Y lo más probable es que los animales infectados por vía natural lo hagan tras haber estado expuestos a cargas infecciosas bajas repetidas en lugar de a una o dos dosis masivas.

La diferencia entre nuestros resultados negativos a las técnicas convencionales y los obtenidos por Simmons y colaboradores en 2011 podría deberse a la utilización de diferentes razas ovinas o al aislado de scrapie atípico utilizado, pero, se trata, como ya hemos comentado, de los mismos utilizados en el capítulo de inoculación intracerebral con éxito, lo que nos lleva a pensar en otros parámetros.

Podría ser debido a que la cantidad de inóculo administrado en nuestro caso (1,5 gramos) esté por debajo del umbral para infectar ovejas de estos genotipos. En el estudio de Simmons y colaboradores los animales recibieron por vía oral dos dosis con 2,5 gramos de homogeneizado de encéfalo cada una. La primera antes de las 24 horas de vida y la segunda 14 días después.

Un estudio de González y colaboradores en 2014, probó diferentes dosis de 1 gramo y 5 gramos, respectivamente para inoculación oral de scrapie clásico en corderos de 7 a 13 días de edad y de alta susceptibilidad genética y no se encontraron diferencias entre ambos grupos (González et al., 2014). Esto sugiere que en este modelo de scrapie y en este tipo de animales la dosis de

1 gramo produce un efecto de saturación. En nuestro trabajo, al tratarse de otra variante de la enfermedad, no podemos estar seguros de extrapolar esta conclusión y no podemos probar definitivamente que la cantidad de inóculo fue adecuada sin realizar estudios adicionales.

Otra diferencia, quizás más importante, entre los diseños experimentales de ambos estudios, es la edad a la que los animales fueron inoculados. En nuestro estudio, los animales fueron inoculados tras el destete, cuando tenían entre 3 y 4 meses de vida.

Asimismo, se conoce que con la edad disminuye la susceptibilidad del animal a la infección oral natural y experimental por scrapie clásico, debido a la involución del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (St Rose et al., 2006), y se ha demostrado que la mucosa intestinal neonatal permite el paso relativamente libre de moléculas de proteína (p. ej., inmunoglobulinas y otras) desde el contenido luminal hacia el sistema linfático hasta 24 horas después del nacimiento.

En consecuencia, hay que resaltar que existen estudios que apoyan la hipótesis de que, en el caso del scrapie clásico, los animales más jóvenes tienen mayor susceptibilidad a la infección experimental vía oral, ya que se han realizado experimentos de inoculación oral con scrapie clásico en ovinos de diferentes edades y los animales de menor edad muestran tasas de ataque más altas, y se requiere menor dosis de inóculo para inducir la enfermedad, en relación a animales mayores (Hamir et al., 2009). Aunque en la mayoría de los experimentos con este agente priónico se han inoculado animales de corta edad, cuando el animal aun es monogástrico, hay que decir que en otros experimentos también se ha logrado la inoculación oral con éxito en animales adultos (Jeffrey, Ryder, et al., 2001; Ryder et al., 2009).

Teniendo en cuenta las diferencias existentes entre la patogenia de las dos enfermedades, no podemos extrapolar los resultados obtenidos en experimentos con scrapie clásico y se plantea la necesidad de realizar nuevas infecciones experimentales por vía oral en animales de diferentes edades para estudiar la evolución de la susceptibilidad de acuerdo a este parámetro.

Aunque la longevidad de los ovinos puede superar los 15 años, en las condiciones de producción estándar en los rebaños europeos la esperanza de vida media es de 7 años, siendo la vida útil máxima 12 años (Chen et al., 2009). Por este motivo, después de haber transcurrido más de 10 años tras la inoculación, se decidió poner punto final al experimento. Debido a la ausencia de PrP^{Sc} detectable en tejidos linforreticulares de ovejas con scrapie atípico, no se puede utilizar el diagnóstico *in vivo* mediante biopsias para determinar la existencia de infección subclínica. A pesar de encontrarse en buen estado de salud y asintomáticos, los últimos 3 animales fueron eutanasiados cuando contaban con casi 11 años de vida para poder examinar sus tejidos y determinar si habían contraído la infección.

En el trabajo de Simmons y colaboradores solo detectaron PrP^{Sc} mediante IHQ en 2 de los 12 animales inoculados, sin embargo, mediante bioensayo se demostró infectividad también en encéfalo e íleon de otros animales en los que no se había detectado PrP^{Sc} mediante IHQ.

Otros estudios también han demostrado que, a pesar de no haberse detectado depósito de PrP^{Sc} por técnicas convencionales en tejidos periféricos de ovejas infectadas con scrapie atípico, sí

han mostrado infectividad mediante bioensayo en ratones transgénicos (Andreoletti et al., 2011), lo que pone de manifiesto la necesidad de confirmar los resultados de nuestro experimento utilizando esta técnica de bioensayo en ratones ovinizados susceptibles, ya que plantea una preocupación sobre las posibles fuentes de material infeccioso para la transmisión natural. Este experimento de bioensayo está actualmente en curso utilizándose ratones Tg338, que sobreexpresan la variante VRQ/VRQ de la PrP ovina, y en ratones transgénicos TgBov que sobreexpresan la PrP bovina.

Estos estudios de bioensayo son especialmente necesarios, tras el resultado de la técnica de PMCA, que muestra amplificación de priones en el encéfalo de una de las ovejas a partir de sustrato de encéfalo de ratones transgénicos TgBov, teniendo en cuenta que esos priones manifiestan unas características bioquímicas compatibles con priones causantes de la EEB. Este resultado parece indicar que, en esa oveja, los priones podrían haber alcanzado el SNC, a partir de la inoculación oral, aunque en pequeña cantidad, lo que explicaría que esos animales permanecieran asintomáticos y que el resto de técnicas de diagnóstico empleadas arrojasen resultados negativos. Con el bioensayo podremos conocer si los tejidos de estos animales podrían ser infectivos para otros animales, con los que convivan, o para el ser humano a través de la cadena alimenticia, que sería especialmente preocupante si estos priones se hubieran transformado en priones de la EEB.

A pesar de que, históricamente, el scrapie atípico se ha considerado una enfermedad no transmisible en condiciones naturales y ha estado exenta de algunas de las medidas de control implantadas para el control del scrapie clásico, estudios como los citados anteriormente, así como otros que han demostrado cambios fenotípicos en esta enfermedad que implican un posible origen del scrapie clásico (Simmons et al., 2015) y la EEB clásica (Huor et al., 2019), indican la posible relevancia biológica de la enfermedad y la importancia de continuar investigando en sus vías de transmisión.

Así mismo, aunque no existe evidencia epidemiológica que respalde la propagación eficiente de la enfermedad en el campo, sí que podría existir una propagación forzada, con altas dosis a través de la alimentación animal, si se flexibilizaran las restricciones alimentarias actuales.

6. ESTUDIO Nº 4. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DEL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO A LA ESPECIE PORCINA.

6.1. INTRODUCCIÓN

Las EET son enfermedades neurodegenerativas que afectan a los seres humanos y a diversas especies animales. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra el scrapie (clásico y atípico) de ovejas y cabras, la EEC de los cérvidos, la EEB en los bovinos y la vECJ en humanos. Se caracterizan por la presencia de una proteína anómala, la PrP^{Sc}, también denominado prion, que es una isoforma anormal de una glicoproteína de membrana citoplasmática codificada por el hospedador denominada PrP celular. Ambas proteínas presentan la misma secuencia de aminoácidos, pero difieren en su estructura secundaria (Prusiner, 1998). La transmisión natural de las EET en animales implica una exposición oral con el agente (Wilesmith et al., 1988). El rango de especies animales susceptibles a cada una de las cepas del agente causal, puede ampliarse mediante la administración, por distintas vías, de un homogeneizado de encéfalo de un animal afectado por dicha cepa priónica a un animal de otra especie, no considerado huésped natural. Varios estudios han utilizado la vía intracerebral de inoculación, ya que esta vía es la que se considera el medio más eficaz y más rápido de transmitir los agentes de las EET a los huéspedes potencialmente susceptibles. La falta de transmisión o una tasa de ataque baja después de una inoculación intracerebral es indicativa de una barrera de transmisión más alta a la infección por una cepa particular de priones.

En la especie porcina, hasta la fecha, no se ha descrito ningún caso de EET de origen natural, a pesar de que estudios epidemiológicos realizados en Reino Unido demostraron que piensos elaborados con restos de pequeños rumiantes afectados por scrapie, fueron utilizados para alimentación porcina, antes de la prohibición del uso de las harinas de carne y huesos en la fabricación de pienso para animales en 1996 (Wells et al., 2003). Estos mismos piensos utilizados como fuente de proteínas para rumiantes, se consideran los responsables de la propagación de la EEB (Wilesmith et al., 1991).

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios experimentales para tratar de transmitir alguna enfermedad priónica a la especie porcina.

En cerdos inoculados por vía intracerebral con EEB clásica, se ha reproducido una enfermedad neurológica con signos clínicos compatibles con el padecimiento de una EET (Dawson et al., 1990; Konold et al., 2009). La neuropatología asociada a esta infección experimental mostró zonas de vacuolización en distintas áreas del encéfalo y mediante la técnica de IHQ se encontraron depósitos de PrP^{Sc} ampliamente distribuidos en el encéfalo de los cerdos infectados (Ryder et al., 2000).

Un estudio de infectividad, en el que se inocularon tejidos de cerdos infectados con EEB, a ratones de las líneas RIII o C57BLJ6, detectó positividad en el SNC (cerebro y médula espinal) de todos los cerdos que desarrollaron encefalopatía espongiforme. También se encontró infectividad en estómago, yeyuno, íleon distal y en el páncreas de los cerdos afectados en fase terminal de la enfermedad (Wells et al., 2003).

Otro trabajo posterior demostró la susceptibilidad de la especie porcina a la inoculación intracerebral con el agente de la EEB, pasado por la especie ovina. Los animales ensayados mostraron signos clínicos neurológicos y presencia de la PrP^{Sc} detectada por IDEXX e IHQ en varias áreas del encéfalo. También mostraron presencia de la proteína prion en retina, SNP, tonsila palatina, linfonodos mediastínicos y mesentéricos, estómago, intestino, músculo óculomotor, glándula adrenal, hígado y páncreas (Hedman et al., 2016). También fue detectada la presencia de PrP^{Sc} en células blancas de la sangre utilizando la técnica de PMCA y la realización de un bioensayo en ratones transgénicos que sobreexpresan la PrP^{C} bovina TgBov, mostró infectividad de tejidos linfoides, músculo estriado y nervios periféricos de los cerdos afectados por EEB ovina de forma experimental (Hedman et al., 2018).

Se ha sugerido que la EEB de origen ovino es más patógena que la EEB clásica (Padilla et al., 2011). Konold y colaboradores observaron una tasa de ataque parcial tras la inoculación intracerebral de cerdos con EEB clásica (Konold et al., 2009) y Wells y colaboradores vieron que el ganado porcino es aparentemente resistente a la EEB clásica después de la exposición oral (Wells et al., 2003).

También se ha demostrado la transmisibilidad de la ECC de los cérvidos al cerdo, detectándose es este caso la proteína responsable de la enfermedad en el animal inoculado, mediante RT-QuIC solo 6 meses tras la infección experimental. Sin embargo, la cantidad de proteína infecciosa acumulada en estos animales fue muy baja y los bioensayos posteriores en ratones transgénicos porcinos demostraron una fuerte barrera de transmisión para la propagación del prion de la ECC de los cérvidos en cerdos (Moore et al., 2017).

Estos resultados podrían causar preocupación en la salud pública, debido a la amplia utilización del cerdo como fuente de alimentación humana, y el uso cada vez más extendido de estos animales como donantes de injertos. Hay un informe, sobre la identificación de un caso de la vCJD en un paciente humano receptor de duramadre porcina (Heath et al., 2006). En base a esto y el descubrimiento de nuevas cepas de priones, se han realizado varios estudios experimentales de transmisión entre especies para determinar el rango de hospedadores de las diferentes EET.

En cuanto a la susceptibilidad de los cerdos a la infección con priones de origen ovino, también se han realizado diversos estudios para valorarlo. En 2016 Greenlee y colaboradores encontraron depósito e infectividad de PrP^{Sc} en cerdos inoculados con un aislado de scrapie clásico, pero los animales no desarrollaron signos clínicos y solo se detectó positividad en los animales sacrificados 51 meses tras la inoculación (Greenlee et al., 2016).

Un estudio en 2009 probó un amplio número de homogeneizados de encéfalos de ovinos con scrapie, de diferentes genotipos y diferentes características bioquímicas en ratones transgénicos TgPo (PoPrP-Tg001) que sobreexpresaban la PrP porcina. El único aislado de scrapie capaz de transmitirse en estos ratones, tras una inoculación intracerebral fue el aislado de scrapie atípico SC-PS152, aunque con tasa de ataque baja. Además, este aislado atípico de scrapie experimentó un fuerte cambio molecular, adquiriendo propiedades bioquímicas similares a las de la EEB de origen ovino cuando se transmitió a ratones TgPo (Espinosa et al., 2009). Sin embargo, el mismo

aislado atípico de scrapie no pudo reproducir la infección cuando se volvió a inocular en ratones TgPo en un estudio posterior (Espinosa et al., 2021) dejando abierta la cuestión de si los cerdos son susceptibles o no al scrapie atípico.

Otros estudios han demostrado la aparición de priones de la EEB a partir de cepas atípicas de scrapie, tanto *in vivo* como *in vitro*. La transmisión de aislados atípicos de scrapie de 5 países europeos diferentes a ratones que expresan la proteína priónica bovina dio como resultado la aparición de EEB. La amplificación *in vitro* en serie de estos aislados de scrapie atípico mediante amplificación cíclica de plegamiento incorrecto de proteínas (PMCA) en sustratos de PrP bovinos y ovinos demostró que la proteína prion responsable de la EEB clásica surge como la cepa dominante en ambos sustratos de PrP (Huor et al., 2019).

En el presente estudio, se probó la susceptibilidad de los cerdos a dos cepas atípicas de scrapie mediante inoculación intracerebral. Los animales infectados no mostraron signos clínicos compatibles con una EET, y en los tejidos muestreados en la necropsia no se detectó PrP^{Sc} mediante técnicas convencionales. Además, no se encontró infectividad en tejidos cerebrales de cerdos inoculados con scrapie atípico mediante bioensayo en ratones TgPo. Sorprendentemente, las reacciones de PMCA realizadas con material encefálico de siete de los cerdos resultaron positivas para la propagación de priones de EEB clásica. Se obtuvieron reacciones positivas de PMCA de cerdos inoculados con cualquiera de los dos aislados atípicos originales. Estos resultados corroboran que la EEB puede surgir durante el paso del scrapie atípico entre diferentes especies de animales y que los cerdos podrían actuar como reservorio de esta enfermedad.

6.2. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio es determinar de la transmisibilidad del agente del scrapie atípico a la especie porcina, su distribución por el organismo y la infectividad de los tejidos afectados en los animales.

6.3. MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1. Selección de animales

Se utilizaron un total de doce animales de la especie porcina, raza minipig. Estos animales fueron adquiridos en El Centro de Transferencia Tecnológica “La Chimenea” de Aranjuez, perteneciente al Instituto Madrileño de Investigación y Desarrollo Rural, Agrario y Alimentario (IMIDRA) de la Comunidad de Madrid. En dicho Centro se crían estos animales exclusivamente para la realización de investigaciones biomédicas.

Los animales se adquirieron con una edad de siete meses y fueron inoculados vía intracerebral dos meses y medio después.

A su llegada al animalario del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, los animales se dividieron en dos lotes uno de siete y otro de seis animales respectivamente. Se pretendía utilizar únicamente hembras por su mayor facilidad de manejo, menor peso adulto y menor agresividad entre ellos, pero al no poder conseguir doce hembras, se completó el estudio con un macho, que fue sometido a una castración quirúrgica poco tiempo después de su llegada.

6.3.2. Inóculos utilizados

Para este estudio, se utilizaron dos inóculos diferentes, ambos provenientes de un animal de la especie ovina afectado por scrapie atípico.

Uno fue el inóculo PS152 (aislado de origen francés) que se preparó con el encéfalo de una oveja en fase clínica e infectada con scrapie atípico de forma natural, de genotipo AfRQ/AfRQ. Este aislado fue proporcionado por UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

El otro inóculo fue TOA3 (aislado de origen catalán) que se obtuvo a partir del encéfalo de una oveja afectada por scrapie atípico de forma natural, y sacrificada en fase clínica de la enfermedad. El genotipo de esta oveja era también AfRQ/AfRQ. Este aislado fue proporcionado por el grupo de investigación de enfermedades priónicas del IRTA-CReSA y la Universitat Autònoma de Barcelona.

6.3.3. Procedimiento experimental con los animales

Todos los procedimientos experimentales realizados con los cerdos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza con el código PI 13/10. El Comité de Ética CISA-INIA aprobó el protocolo experimental en ratones (Número de permiso: CEEA 2009/004). El cuidado y uso de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal recogida en el RD 53/2013, que cumple con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Con los doce animales disponibles se realizaron dos lotes de seis animales y cada uno de estos lotes se inoculó con uno de los dos aislados disponibles. Todos los animales recibieron 0,5 mililitros del homogeneizado PS152 o TOA3. Ambos inóculos estaban preparados con homogeneizado de tejido encefálico al 10% en solución salina estéril, por lo que cada animal recibió en total 0,05 gramos de tejido nervioso.

Para proceder a la inoculación se realizó una pequeña perforación en el hueso craneal con ayuda de un taladro especial para hueso. Antes de insertar el taladro, se realizó una incisión cutánea parasagital de 1 cm sobre el punto de inoculación para exponer el periostio. El lugar de elección fue a nivel del seno frontal a un centímetro de la línea media. Posteriormente se depositó el inóculo en la región frontal de la corteza cerebral, con una aguja hipodérmica de 25G de diámetro (Fig x). Todo esto se realizó bajo un plano anestésico profundo con xilacina y ketamina. Tras la inoculación, se suturó la incisión y los cerdos recibieron tratamiento antibiótico

intramuscular (bencilpenicilina procaína, 10 mg / kg) y analgesia intramuscular (flunixina, 2,2 mg / kg).

Figura 15. Imagen de la inoculación intracerebral con scrapie atípico en uno de los cerdos utilizados en el estudio

6.3.4. Vigilancia y valoración clínica

Tras la infección experimental se realizaron observaciones diarias por el personal cuidador en el momento de administrar la alimentación y tres veces por semana por el personal investigador, durante toda la duración del experimento, para valorar la posible aparición de alteraciones del aparato locomotor. Una vez al mes se realizó una monitorización clínica más completa enfocada a detectar cualquier signo clínico que pudiera estar relacionado con el padecimiento de una encefalopatía.

Alguno de los signos que se esperaban encontrar son los detectados por otros autores en infecciones experimentales por otras cepas priónicas: Cambios de comportamiento, depresión, hiperreacción a estímulos, confusión, ataxia, y posiciones anómalas de cabeza y orejas (Hedman et al., 2016).

6.3.5. Recogida de muestras y tejidos de los animales

Todos los animales fueron eutanasiados entre los 632 y los 2154 días post-inoculación mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico. Previamente a la eutanasia se realizó una toma de muestras de sangre, con el fin de obtener, suero, plasma, sangre entera y células blancas de la sangre.

Inmediatamente después de la eutanasia se realizó una necropsia completa y sistemática del animal en la que se recogieron muestras de los siguientes órganos y tejidos por duplicado:

SNC: Corteza frontal, núcleos basales, tálamo, hipotálamo, corteza occipital, hipocampo, mesencéfalo, puente, cerebelo, médula oblonga (óbex), medula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar.

SNP: Ganglio del trigémino, nervio braquial, nervio ciático, ojo y músculos exoculares.

SLR: Linfonodos mediastínico, mesentérico, retrofaríngeo, submandibular, preescapular, precural, poplíteo e iliaco; bazo, placas de Peyer y amígdalas.

TGI: esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto.

Otros órganos: Pulmón, corazón, hígado, páncreas, músculos tríceps braquial y bíceps femoral, piel de la extremidad posterior a nivel del muslo, riñón, glándula adrenal, vejiga, útero y ovarios.

Una de las muestras se guardó en formol tamponado al 10% para el estudio histopatológico e Inmunohistoquímico y la otra se congeló a -80ºC para realizar la técnica de diagnóstico de ELISA y de Western Blot.

Además, se recogió adicionalmente un grupo de muestras tomadas de forma aséptica para realizar inóculos destinados a bioensayos en modelo murino (corteza frontal, tálamo, corteza occipital, cerebelo, médula oblonga, nervio braquial, nervio ciático, músculos exoculares, bazo, linfonodo mesentérico y placa de Peyer). Estas muestras también se almacenaron a -80ºC hasta la preparación de lo inóculos.

6.3.6. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Las muestras recogidas en formol, se mantuvieron durante 48 horas para una correcta fijación y posteriormente se tallaron e incluyeron en parafina siguiendo el procedimiento histopatológico estándar (anexo 1). Se cortaron secciones de 4 µm de espesor usando un micrótomo y se montaron en portaobjetos de vidrio. Uno de los cortes se tiñó con hematoxilina-eosina para su estudio histopatológico (anexo 7).

Otro de los cortes se procesó mediante la técnica de Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc}. Esto se llevó a cabo mediante el protocolo de la técnica descrito en el anexo 2. Se realizaron una serie de pretratamientos para el desenmascaramiento de epítopos con ácido fórmico, proteinasa K y autoclavado hidratado. Posteriormente se realizó la incubación con el anticuerpo monoclonal 2G11 (1:400) a temperatura ambiente, durante una hora.

6.3.7. Detección de PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA

A partir de las muestras recogidas en la necropsia y guardadas congeladas a -80ºC, se realizó una técnica de diagnóstico ELISA mediante el kit de IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (anexo 3). Las muestras empleadas fueron diferentes secciones del Sistema Nervioso Central, concretamente corteza frontal, óbex y cerebelo. De cada una de estas muestras se talló 0,3 gramos para su trituración en un tubo suministrado por el kit y se realizaron 2 ciclos de trituración, dejando enfriar los homogeneizados entre ciclos. El punto de corte aplicado fue el establecido por los fabricantes del kit diagnóstico para tejido nervioso y linfoide en pequeños rumiantes, concretamente 0,14 unidades de absorbancia.

Como controles positivos para esta técnica, además de los suministrados por el kit, se añadieron corteza frontal, cerebelo y óbex de una oveja positiva a scrapie atípico y de un cerdo positivo a EEB ovina.

6.3.8. Detección de PrP^{Sc} mediante Western Blot

El análisis bioquímico se realizó mediante transferencia Western Blot a partir de un homogeneizado al 10% utilizando las siguientes regiones anatómicas del encéfalo: corteza

frontal, tálamo, cerebelo, corteza occipital y óbex. Las muestras frescas se trataron con PK (50 µg / ml), se sometieron a electroforesis y se transfirieron a membranas usando el protocolo de prueba Prionics AG Check® Western BSE. La inmunodetección se realizó usando anticuerpos monoclonales Sha31 (1 µg / ml) y 12B2 (4 µg / ml) (anexo 6).

6.3.9. Bioensayo en ratón

En la necropsia de todos los cerdos se recogió de forma aséptica parte del encéfalo para la posterior preparación de inóculos, concretamente se recogió tejido de las siguientes zonas: corteza frontal, tálamo, corteza occipital, cerebelo y óbex.

Con este tejido se preparó un homogeneizado al 10% en solución salina estéril (anexo 4) y se envió al CISA-INIA para su inoculación en la línea de ratón transgénico PoPrP-Tg001 (TgPo). Esta línea de ratón expresa la PrP^{C} porcina (alrededor de cuatro veces el nivel de expresión en cerebro de cerdo) bajo el control del promotor del gen *PRNP* de ratón (Castilla et al., 2004).

La inoculación se realizó en ratones de 6-10 semanas de edad identificados individualmente y anestesiados con isoflurano. Cada animal recibió 2 microgramos de homogeneizado cerebral en el lóbulo parietal derecho utilizando una aguja hipodérmica desechable de calibre 25G. Tras el procedimiento los ratones se observaron diariamente y se evaluó su estado neurológico semanalmente. Ningún ratón presentó síntomas y fueron eutanasiados todos ellos cuando envejecieron demasiado (> 650 dpi), por razones éticas. Una vez sacrificados, se realizó la necropsia y se extrajo el encéfalo. Una parte se fijó por inmersión en formalina al 10% para cuantificar la degeneración espongiforme por histopatología y la acumulación de PrP resistente a proteinasa K (PK) (PrP^{res}) por inmunohistoquímica (IHC) o histoblotting y la otra parte se congeló a -20°C para determinar la presencia de PrP^{res} por Western Blot.

6.3.10 Amplificación PMCA

Con las muestras de encéfalos de los cerdos inoculados se realizó la técnica de PMCA. Para preparar el sustrato se utilizaron encéfalos de ratones transgénicos TgBov que sobreexpresan PrP bovina (Castilla et al., 2003) (10% p/vol en tampón de conversión PMCA) que se complementó con 0,25% p/vol de dextrano de bajo peso molecular. Las reacciones de PMCA (50 µl de volumen final) se realizaron en microplacas de 96 pocillos y se sometieron a 3 rondas de amplificación (15s de sonicación, 14 min de incubación de 50s a 39°C) en un sonicador Qsonica700. Estas condiciones aseguran una amplificación positiva de 10^{-9} aislado de EEB de referencia diluido. Después de cada ronda, los productos de reacción se diluyeron 1/10 en sustrato nuevo y se sometieron a una nueva ronda de PMCA (anexo 8).

Las regiones del encéfalo del cerdo para la realización de esta técnica se seleccionaron de acuerdo con la distribución de las lesiones neuropatológicas notificadas en los cerdos inoculados con EEB clásica y EEB ovina (Hedman et al., 2016; Ryder et al., 2000). En estos animales, las lesiones más graves se describieron en áreas como la corteza cerebral y parietal, cerebelo y mesencéfalo. La corteza frontal no se sometió a PMCA ya que los cerdos fueron inoculados en esta área del cerebro y podría mantener un cierto nivel de persistencia del inóculo que resultaría

en una amplificación positiva mediante una técnica ultrasensible como PMCA (Martin et al., 2021).

En nuestro caso las áreas seleccionadas para realizar la PMCA fueron: Corteza parietal (CP), Corteza occipital (CO), cerebelo (CBL), mesencéfalo (MES) y médula espinal cervical (MEC).

Cada área encefálica se ensayó por cuadruplicado y los productos de reacción de PMCA se analizaron a ciegas mediante Western Blot para determinar la presencia de PrP^{res} utilizando los anticuerpos monoclonales anti-PrP Sha31 y 12B2 y utilizando como control de la técnica un aislado de scrapie clásico (anexo 6). Para detectar cualquier posible contaminación cruzada que pudiera dar lugar a un resultado falso positivo, se colocaron controles sin sustrato en la microplaca cada 8 pocillos sembrados y se descartó la placa completa cuando se detectó una amplificación inespecífica. En caso de amplificación positiva, se volvieron a analizar 12 réplicas de la muestra en las mismas condiciones. Cuando todas las áreas del encéfalo de un animal fueron negativas para la amplificación de PMCA, se volvió a analizar un área seleccionada del encéfalo en 12 repeticiones para confirmar el resultado negativo.

6.4. RESULTADOS

6.4.1. Valoración clínica

Tabla 16. Relación de cerdos inoculados por vía intracerebral con dos aislados de scrapie atípico.

ANIMAL	INÓCULO	SEXO	MESES POSTINOCULACIÓN	MOTIVO DE LA EUTANASIA
P-1217	PS152	HEMBRA	28	Electivo
P-1216	PS152	HEMBRA	44	Electivo
P-1213	PS152	HEMBRA	48	Úlcera gástrica
P-1212	PS152	HEMBRA	50	Infección uterina
P-1215	PS152	HEMBRA	62	Electivo
P-1214	PS152	HEMBRA	72	Electivo
P-1226	TOA3	HEMBRA	21	Infección oído
P-1231	TOA3	MACHO CAST.	35	Electivo
P-1228	TOA3	HEMBRA	47	Infección uterina
P-1229	TOA3	HEMBRA	48	Infección uterina
P-1227	TOA3	HEMBRA	62	Electivo
P-1230	TOA3	HEMBRA	67	Infección uterina

Las observaciones periódicas realizadas a los doce animales sometidos a inoculación intracerebral con los dos homogeneizados de scrapie atípico no revelaron en ningún momento

signos clínicos neurológicos compatibles con el padecimiento de una EET, tampoco presentaban signos clínicos neurológicos en el momento de la eutanasia. Sin embargo, varios cerdos desarrollaron patologías concomitantes y fueron eutanasiados cuando su bienestar se vio comprometido.

Otros animales fueron sacrificados de forma electiva para valorar la evolución de la enfermedad, después de transcurrir al menos 2 años tras la inoculación. Esta eutanasia electiva de los animales se llevó a cabo en tiempos post-inoculación similares para ambos grupos de inoculación excepto para el cerdo P-1216, que fue sacrificado unos meses después de P-1231 porque este último no mostró presencia de PrP^{Sc} en el encéfalo y se decidió posponer la eutanasia del siguiente animal (tabla 16).

6.4.2. Métodos clásicos de detección de la PrP^{Sc}

Tras la tinción de hematoxilina-eosina de todos los tejidos recogidos en formol, se realizó una observación detallada al microscopio óptico de todas las muestras, prestando especial atención al SNC, en el que tratamos de detectar presencia de la vacuolización característica de estas enfermedades. En ninguna de las regiones encefálicas estudiadas se pudo observar esta lesión histopatológica.

También se observaron al microscopio óptico los cortes histológicos resultantes de la técnica de IHQ, y no se pudo evidenciar ninguna tinción compatible con la presencia de la PrP^{Sc} en ninguna región anatómica del SNC, ni del resto de tejidos recogidos de los animales (no se muestra este resultado).

Tampoco arrojó ningún resultado positivo la técnica de Western Blot realizada con el encéfalo de todos los animales, para detectar proteína prion (no se muestra dicho resultado).

Respecto a la técnica ELISA, con la cual se testaron corteza frontal, cerebelo y óbex de todos los animales, ninguna de las muestras ofreció un resultado mayor de 0,14, por lo cual fueron consideradas negativas. Sí que se obtuvo un resultado positivo en las 3 zonas del encéfalo procedentes de un cerdo inoculado con EEB ovina y en corteza frontal y cerebelo de una oveja inoculada con scrapie atípico, procedente del primer capítulo de este trabajo. En esta oveja el óbex dio un resultado negativo (tabla 17).

Tabla 17. Resultados de la técnica de ELISA de distintas áreas del encéfalo de los cerdos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico.

IDENTIFICACIÓN	ÁREA ENCÉFALO	RESULTADO
P-1212	Corteza frontal	0,018
	Cerebelo	0,019
	Óbex	0,020
P-1213	Corteza frontal	0,024
	Cerebelo	0,018
	Óbex	0,020
P-1214	Corteza frontal	0,020
	Cerebelo	0,019
	Óbex	0,015
P-1215	Corteza frontal	0,019
	Cerebelo	0,022
	Óbex	0,020
P-1216	Corteza frontal	0,026
	Cerebelo	0,020
	Óbex	0,017
P-1217	Corteza frontal	0,018
	Cerebelo	0,015
	Óbex	0,016
P-1226	Corteza frontal	0,021
	Cerebelo	0,016
	Óbex	0,029
P-1227	Corteza frontal	0,022
	Cerebelo	0,017
	Óbex	0,014
P-1228	Corteza frontal	0,029
	Cerebelo	0,027
	Óbex	0,021
P-1229	Corteza frontal	0,021
	Cerebelo	0,018
	Óbex	0,019
P-1230	Corteza frontal	0,029
	Cerebelo	0,026
	Óbex	0,021
P-1231	Corteza frontal	0,019
	Cerebelo	0,024
	Óbex	0,033
Ov Sc. Atip	Corteza frontal	2,878
	Cerebelo	0,825
	Óbex	0,030
Cerdo BSE Ov	Corteza frontal	3,372
	Cerebelo	3,374
	Óbex	2,869

6.4.3. Bioensayo en ratones transgénicos que expresan la PrP^C porcina (TgPo)

Para determinar la infectividad del encéfalo de los cerdos inoculados se realizó bioensayo en ratones TgPo, este bioensayo se hizo en el laboratorio del CISA-INIA en Madrid. Se seleccionaron ratones TgPo como modelo apropiado, porque esta línea sobreexpresa la PrP de cerdo (cuatro veces el nivel de expresión en el cerebro de cerdo), por lo que no representa una barrera de transmisión para los priones porcinos (Espinosa et al., 2009). Todos los ratones se eutanasiaron después de 650 días tras la inoculación (dpi), sin mostrar signos clínicos compatibles con una EET. Se analizó el encéfalo de estos ratones y ninguno de ellos resultó positivo para la acumulación de PrP^{Sc} en su encéfalo. Los detalles del bioensayo en ratón se representan en la siguiente tabla.

Tabla 18. Resultados bioensayo de los ratones TgPo inoculados con un homogeneizado de encéfalo al 10% de cada uno de los cerdos inoculados con scrapie atípico

ENCÉFALO INOCULADO	TASA DE ATAQUE	Tiempo de supervivencia Días postinoculación.
P-1212	0/5	>650
P-1213	0/5	>650
P-1214	0/5	>650
P-1215	0/7	>650
P-1216	0/5	>650
P-1217	0/5	>650
P-1226	0/6	>650
P-1227	0/6	>650
P-1228	0/5	>650
P-1229	0/5	>650
P-1230	0/5	>650
P-1231	0/5	>650

6.4.4. Resultados PMCA

Recientemente, un estudio en el que ha participado nuestro grupo de investigación ha demostrado, mediante propagación *in vitro* por PMCA, que los priones responsables de la EEB clásica pueden estar presentes en los aislados de scrapie atípico ovino y que la EEB clásica puede surgir durante el pase entre especies del scrapie atípico (Huor et al., 2019). Para detectar si habían aparecido priones de la EEB en los cerdos inoculados con scrapie atípico, el encéfalo de estos animales se sometió a PMCA utilizando sustratos de ratones transgénicos que expresan PrP bovina (TgBov). Este sustrato fue seleccionado porque es el más permisivo para la amplificación de EEB, mientras que cuando se utiliza TgPo como sustrato se requieren varias rondas de PMCA para amplificar EEB (Espinosa et al., 2021).

Curiosamente, se detectó amplificación de PrP^{Sc} en las reacciones de PMCA realizadas con tejido encefálico de siete de los cerdos ensayados (tabla 19). Cada área del encéfalo se analizó por cuadruplicado y las reacciones positivas se confirmaron volviendo a analizar la muestra original en 12 repeticiones de PMCA.

El perfil de Western Blot de la PrP^{res} de estas reacciones positivas en la PMCA se caracterizó por un predominio de la banda di-glicosilada, la banda no glicosilada a 19 kDa y la falta de detección con el anticuerpo 12B2. Estas características son indistinguibles de los priones de la EEB clásica y de los productos de reacción PMCA sembrados con priones EEB clásicos. No se detectó PrP^{res} en reacciones de PMCA no sembradas o en aquellas sembradas con homogeneizado de encéfalo de una oveja negativa a cualquier EET.

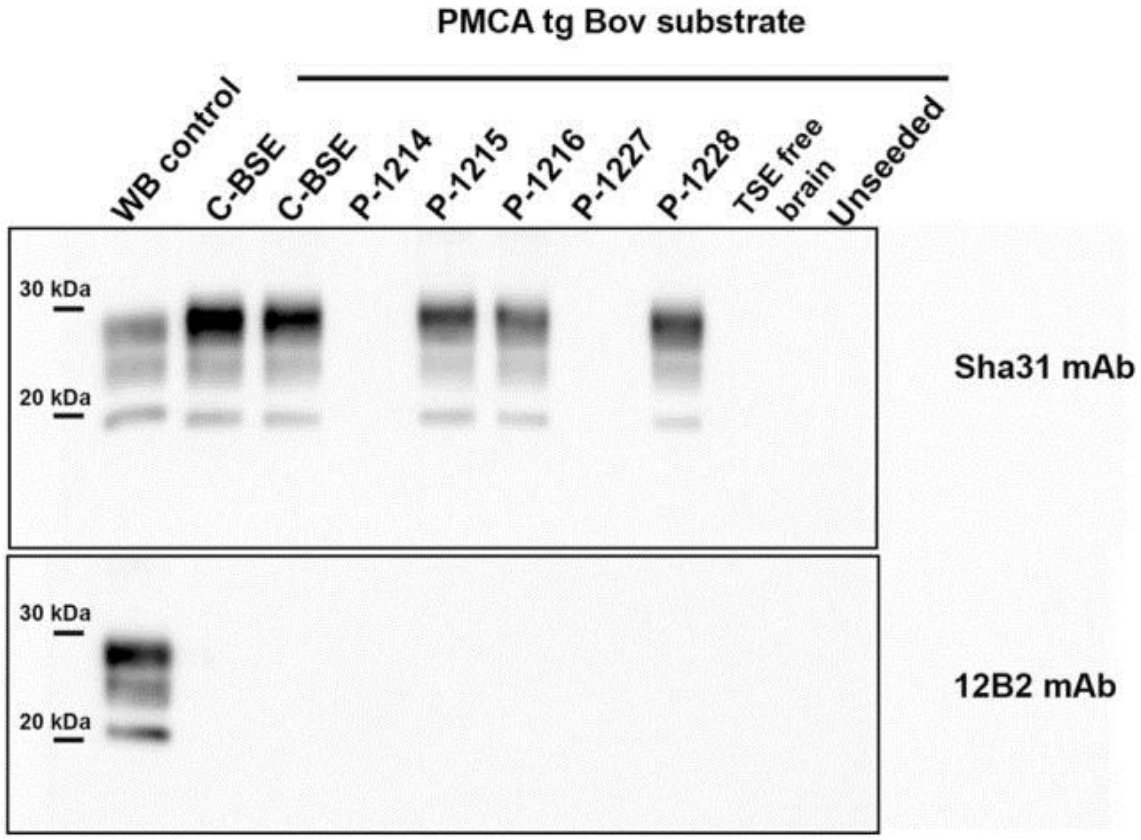


Figura 16. PrP^{res} detectada en reacciones de PMCA sembradas con encéfalo (corteza parietal) de los cerdos inoculados con scrapie atípico. Las reacciones positivas de PMCA muestran un patrón de glicoforma idéntico al de los priones de EEB clásica de bovinos y/o EEB clásica de bovinos propagados en el sustrato de TgBov (tercera línea). Se obtuvieron reacciones positivas de cerdos inoculados con los dos aislados originales de scrapie atípico (aislado PS152: P-1215 y P-1216; aislado TOA3: P-1228). Las reacciones de PMCA sembradas con homogeneizado de encéfalo de una oveja negativa a cualquier EET y las reacciones de PMCA no sembradas se incluyen como controles de la técnica. Las reacciones de PMCA se sometieron a 3 rondas de amplificación (15 s de sonicación, 14 min de 50 s de incubación a 39 ° C) en un sonicador Qsonica700 y se analizaron para PrP^{res} por Western Blot utilizando los anticuerpos monoclonales anti-PrP Sha31 y 12B2. Control de WB = aislado de scrapie clásico.

En la figura 16 se muestran los resultados del WB realizado productos de PMCA realizado con muestras de corteza parietal de algunos de los cerdos inoculados con scrapie atípico. Las reacciones positivas a PMCA muestran un patrón de glicosilación idéntico al de los priones de EEB clásica de bovino y de EEB clásica propagada en sustrato de TgBov (3ª línea). Se obtuvieron reacciones positivas en cerdos inoculados con los dos aislados originales de scrapie atípico (aislado PS152: P-1215 y P-1216; aislado TOA3: P-1228). También se muestran los resultados de los dos controles utilizados (encéfalo de oveja sana y muestras no sembradas).

Tabla 19. Resultados PMCA de muestras de diferentes áreas encefálicas de los cerdos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico utilizando cerebros de ratones TgBov como sustrato.

PORCINO	ÁREA ENCEF	PMCA 1er PASE	PMCA 2º PASE
P-1212	CP	0/4	
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	0/12
	MEC	0/4	
P-1213	CP	0/4	
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	0/12
	MEC	0/4	
P-1214	CP	0/4	
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	0/12
	MEC	0/4	
P-1215	CP	4/4	10/12
	CO	2/4	4/12
	CBL	1/4	ND
	MES	0/4	
	MEC	0/4	
P-1216	CP	2/4	2/12
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	
	MEC	0/4	
P-1217	CP	0/4	
	CO	0/4	
	CBL	1/4	4/12
	MES	1/4	5/12
	MEC	0/4	
P-1226	CP	0/4	0/12
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	

	MEC	0/4	
P-1227	CP	0/4	0/12
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	
	MEC	0/4	
P-1228	CP	0/2	4/12
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	
	MEC	0/4	
P-1229	CP	0/4	
	CO	0/4	
	CBL	0/4	
	MES	0/4	
	MEC	2/4	2/12
P-1230	CP	1/4	ND
	CO	0/4	
	CBL	3/4	4/12
	MES	1/4	ND
	MEC	0/4	
P-1231	CP	0/4	
	CO	1/4	2/12
	CBL	2/4	7/12
	MES	1/4	7/12
	MEC	0/4	

CP: Corteza parietal; CO: Corteza occipital; CBL: Cerebelo; MES: Mesencéfalo; MEC: Médula Espinal Cervical.

6.5. DISCUSIÓN

La crisis de la EEB fue seguida por la aparición de EET en especies que nunca habían sido diagnosticados con enfermedades priónicas y por la aparición en los seres humanos de vCJD (Hill et al., 1997; Sigurdson & Miller, 2003). Sin embargo, en el ganado porcino no se ha descrito ninguna enfermedad priónica natural, a pesar de que estuvieron expuestos a piensos contaminados con EEB (Matthews & Cooke, 2003). Infecciones experimentales posteriores realizadas en cerdos y en ratones transgénicos que expresan PrP porcina han demostrado que, aunque los cerdos presentan una fuerte barrera de transmisión, no son completamente resistentes a determinados priones (Castilla et al., 2004; Espinosa et al., 2009; Hedman et al., 2016).

La posible transmisión de una EET a los cerdos es un importante problema de salud pública debido al amplio uso de la carne de cerdo como fuente de alimento humano, y al uso cada vez mayor de cerdos como donantes de tejidos, habiéndose reportado un caso de vCJD en un paciente que recibió un injerto de duramadre porcina (Heath et al., 2006).

Aunque los cerdos aparentemente no son susceptibles a la EEB clásica después de la exposición oral (Dawson et al., 1990; Ryder et al., 2000; Wells et al., 2003), sí que se ha detectado infectividad en tejidos de cerdos inoculados por vía oral con scrapie clásico o ECC de los cérvidos (Greenlee et al., 2016; Moore et al., 2017). Además, estos cerdos positivos inoculados por vía oral suelen ser subclínicos, lo que podría representar un problema de salud pública, ya que estos animales podrían llegar al matadero sin mostrar signos sospechosos de enfermedad priónica.

En el presente estudio, evaluamos la transmisibilidad del scrapie atípico a los cerdos. Los animales se sacrificaron entre 22 y 72 meses después de la inoculación (mpi) y se analizaron sus tejidos para determinar la acumulación y la infectividad de PrP^{Sc}. No encontramos evidencia de transmisión a ninguno de los animales por IHQ, ELISA, Western Blot o bioensayo en ratón.

Otros trabajos detectaron acumulación de PrP^{Sc} en cerdos expuestos a EEB a los 34 mpi (Wells et al., 2003), y a los 22 mpi cuando se inocularon con EEB ovina (Hedman et al., 2016). En cerdos inoculados con scrapie clásico o ECC de los cérvidos, aunque no mostraron signos clínicos, se detectó presencia de PrP^{Sc} a los 51 mpi en animales inoculados con scrapie clásico (Greenlee et al., 2016) y a los 6 mpi, en el caso de los animales inoculados con ECC de los cérvidos (Moore et al., 2017).

El principal objetivo de este trabajo era probar la capacidad de la cepa atípica de scrapie (Nor98) de propagarse en cerdos, dado que los ratones que expresan PrP porcina (ratones PoPrP-Tg001/TgPo) demostraron ser susceptibles a la inoculación de esta variante de scrapie. Un aislado de scrapie atípico se adaptó a esta línea transgénica, alcanzando una tasa de ataque del 100% y periodos de incubación rápidos en pases seriados (Espinosa et al., 2009), una adaptación similar a la observada con el agente de la EEB clásica (Castilla et al., 2004). Sin embargo, cuando se ensayó nuevamente la propagación de este aislado atípico de scrapie en ratones TgPo, junto con otros aislados de scrapie atípico, no se obtuvieron resultados positivos, ni *in vitro* ni *in vivo* (Espinosa et al., 2021). Estos resultados, junto con los resultados negativos mostrados en el presente estudio, refuerzan la conclusión de que la especie porcina es altamente resistente al scrapie atípico. Sin embargo, solo se realizó un pase en ratones TgPo, y sería interesante realizar más pases en esta línea y/o analizar mediante PMCA los encéfalos de los ratones TgPo para detectar cualquier posible replicación de priones.

Recientemente, se demostró que los priones de la EEB clásica pueden estar presentes como una variante menor en los aislados de scrapie atípico ovino y que la EEB clásica puede surgir durante el paso de estos aislados a ratones PrP bovinos (Huor et al., 2019). Teniendo en cuenta que el aislado atípico de scrapie mencionado anteriormente también adquirió propiedades similares a las de la EEB cuando se transmitió a ratones TgPo (Espinosa et al., 2009), y que la EEB clásica es el único prion que se propaga eficientemente en la PrP porcina (Espinosa et al., 2021; Hedman et al., 2016; Wells et al., 2003), decidimos investigar si los priones de la EEB clásica podrían emerger del scrapie atípico durante la transmisión entre las especies ovino-porcino.

Se realizó la técnica de PMCA con el encéfalo de los cerdos inoculados y, curiosamente, las reacciones de PMCA realizadas con tejido encefálico de 7 de estos animales, propagado en

sustrato de ratones TgBov, mostró PrP^{res} con características bioquímicas idénticas a las de EEB clásica. Se detectó una amplificación positiva de EEB en el encéfalo de cerdos inoculados con los dos aislados de scrapie atípico: PS152 y TOA3, en períodos mínimos de incubación de 28 y 35 meses después de la inoculación, respectivamente. De cada animal, no se obtuvieron reacciones positivas de todas las áreas del cerebro analizadas (Tabla 19). Aunque la PrP^{res} amplificada de los cerdos mostró características bioquímicas de EEB clásica, se requieren más bioensayos en ratones TgBov para saber si estos priones replican las características neuropatológicas de la EEB.

En conjunto, los resultados de este trabajo y los datos obtenidos de otros estudios de transmisión de priones a cerdos y a ratones TgPo, junto con estudios *in vitro* utilizando sustrato porcino; han demostrado que la PrP porcina tiene una capacidad muy limitada para mantener la replicación de priones. No se han descrito polimorfismos significativos para el gen *PRNP* de cerdo (Martin et al., 1995), y se ha sugerido que la flexibilidad conformacional de la secuencia de PrP de cerdo es muy baja, lo que limita el número de conformaciones de PrP^{Sc} capaces de producir plegamiento incorrecto (Espinosa et al., 2021). Tampoco se han encontrado diferencias entre las secuencias de PrP de cerdo y de minipigs (Meng et al., 2005), lo que sugiere que las conclusiones obtenidas aquí podrían extrapolarse a cerdos domésticos de granjas.

Sin embargo, utilizando el sustrato TgBov, hemos demostrado *in vitro* la presencia de actividad de siembra de EEB clásica en algunas áreas del encéfalo de cerdo, lo que sugiere que los priones de EEB clásica emergieron durante la transmisión de priones de scrapie atípico ovino a los cerdos. Curiosamente, los priones de EEB no emergieron del encéfalo de todos los cerdos y, de aquellos de los que sí surgieron, no se detectaron en todas las áreas del encéfalo analizadas. Tampoco se encontró correlación entre el tiempo tras la inoculación y la aparición de la EEB.

Cuando se describió la emergencia de la EEB a partir del scrapie atípico mediante la técnica de PMCA, se asoció a niveles bajos de priones de EEB que estaban presentes en los aislados originales de scrapie atípico (Huor et al., 2019). Es posible que este resultado esté relacionado con la gran resistencia que presentan los cerdos a las enfermedades priónicas, haciendo incompleta la penetración de los priones de la EEB que pudieran estar presentes en el inóculo original. Además, considerando que la cantidad de confórmeros de EEB clásica en los inóculos de scrapie atípico es probablemente muy reducido y quizás no esté distribuido de manera homogénea por todo el aislamiento, también es posible que no todos los cerdos hayan recibido una cantidad suficiente de confórmeros de EEB clásica capaces de ser detectados por PMCA.

Finalmente, debemos considerar que la amplificación de priones por PMCA es a veces un fenómeno estocástico, lo que podría explicar por qué no se obtuvo propagación de EEB de algunos de los cerdos. También se podría discutir que la aparición de EEB clásica a partir de los encéfalos de los cerdos podría estar relacionada con la persistencia del inóculo atípico original de scrapie. Sin embargo, la amplificación de EEB no se obtuvo de todos los cerdos y, en algunos de ellos (P-1217 y P-1231) se detectó propagación de EEB en regiones caudales del encéfalo (cerebelo o corteza occipital) pero no en más áreas rostrales (como la corteza parietal). Si la

amplificación de EEB en muestras de encéfalo de cerdo se asociara a la persistencia del inóculo y no a la propagación auténtica de los priones de EEB, sería de esperar que dicha amplificación se detectara principalmente en las áreas más rostrales del encéfalo. Finalmente, aunque la cantidad de prion generado no fue suficiente para producir enfermedad en los cerdos, estos resultados evidencian nuevamente el problema de que los cerdos podrían actuar como reservorios subclínicos de enfermedades priónicas, como se observa con el scrapie atípico y la ECC de los cérvidos, y que la presencia de priones se puede detectar en cerdos poco después de la exposición a estas enfermedades (Greenlee et al., 2016; Hedman et al., 2016; Moore et al., 2017).

En conclusión, lo hallazgos de este estudio sugieren que, aunque los cerdos presentan una fuerte barrera de transmisión contra la propagación del scrapie atípico, pueden propagar niveles bajos de priones de la EEB. La prevalencia del scrapie atípico y la presencia de infectividad en tejidos de ovejas infectadas con esta enfermedad se subestiman (Andreoletti et al., 2011; Ru, 2017). Dado que los cerdos han demostrado ser susceptibles a otras enfermedades priónicas y a propagar priones sin mostrar signos de enfermedad, no deben interrumpirse las medidas implementadas para prohibir la inclusión de proteínas de rumiantes en la alimentación del ganado.

7. ESTUDIO Nº 5. ESTUDIO DE LA TRANSMISIBILIDAD DEL AGENTE DEL SCRAPIE ATÍPICO A LA ESPECIE BOVINA.

7.1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades priónicas o EET son trastornos neurodegenerativos mortales producidos por la acumulación de una isoforma neurotóxica mal plegada denominada PrP^{Sc} de una proteína normal del organismo, la PrP^{C}. Ambas proteínas presentan la misma secuencia de aminoácidos, pero difieren en su estructura secundaria (Prusiner, 1998). Este cambio conformacional proporciona a la PrP^{Sc} una resistencia parcial a las proteasas y una tendencia a formar agregados, características que se han utilizado ampliamente para el diagnóstico de estos trastornos.

La presencia de la proteína patológica en un huésped puede deberse a tres posibles orígenes: esporádica o idiopática, familiar (provocada por la mutación del gen *PRNP*, que codifica la PrP^{C}) o adquirida mediante exposición a priones. Las enfermedades priónicas pueden afectar a los seres humanos y a diversas especies animales. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra el scrapie (forma clásica y atípica) de los pequeños rumiantes, la ECC de los cérvidos y la EEB de los bovinos.

El rango de especies animales susceptibles a cada una de las cepas priónicas puede ampliarse mediante la administración de un homogeneizado de encéfalo de un animal afectado por dicha cepa priónica a un animal de otra especie, no considerado huésped natural. Esta administración se puede realizar por diferentes vías, pero la mayoría de los estudios han utilizado la vía intracerebral, ya que se considera el medio más eficaz y más rápido de transmitir el agente causal de las EET a los huéspedes potencialmente susceptibles.

La forma clásica de EEB (C-EEB) provocó una de las crisis de seguridad alimentaria más importantes de la historia, debido a su vínculo con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humanos (Bruce et al., 1997). Entre las enfermedades priónicas de los animales, el scrapie atípico es la que tiene la distribución geográfica más amplia (Matsuura et al., 2019; Mitchell et al., 2010). Fue descrita por primera vez en 1998 en Noruega (Benestad et al., 2003), y presenta importantes diferencias neuropatológicas, clínicas, bioquímicas y epidemiológicas con respecto al scrapie clásico.

El origen del scrapie atípico ha sido ampliamente discutido. Debido a sus características epidemiológicas, se ha sugerido que se trata de una enfermedad priónica espontánea (Fediaevsky et al., 2009) y los resultados obtenidos en modelos murinos parecen indicar que este es efectivamente el caso (Vidal et al., 2022). En 2019, se demostró la aparición de C-EEB a partir del scrapie atípico. La transmisión de aislados de scrapie atípico a ratones transgénicos que sobreexpresaban la PrP bovina condujo a la propagación de priones de la EEB clásica. La presencia de niveles bajos de este agente también se demostró en los aislados ovinos originales mediante amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (Huor et al., 2019), una técnica ultrasensible para la detección de priones.

En un estudio previo de esta tesis también se demostró la aparición de la EEB tras la transmisión interespecie del scrapie atípico, en este caso, en un huésped diferente: porcinos inoculados con scrapie atípico. Aunque la inoculación intracerebral del agente no causó enfermedad clínica en

los cerdos, se detectaron priones de C-EEB en varias áreas del encéfalo de estos animales utilizando PMCA, lo que sugiere que los cerdos podrían actuar como reservorio de la EEB (Marín et al., 2021).

En base a esto y al descubrimiento de nuevas cepas de priones, se han realizado varios estudios experimentales de transmisión entre especies para determinar el rango de hospedadores de las diferentes EET. Algunos de estos estudios han demostrado la aparición de priones de la EEB a partir de aislados de scrapie atípico, tanto *in vivo* como *in vitro*. La transmisión de aislados de scrapie atípico procedentes de cinco países europeos diferentes a ratones que expresan la proteína priónica bovina dio como resultado la aparición de EEB. La amplificación *in vitro* en serie de estos aislados de scrapie atípico mediante PMCA en sustratos de PrP bovinos y ovinos demostró que la proteína prion responsable de la EEB clásica surge como la cepa dominante en ambos sustratos de PrP (Huor et al., 2019).

En el presente estudio, se probó la susceptibilidad de los bovinos a una cepa de scrapie atípico mediante inoculación intracerebral. Los animales infectados no mostraron signos clínicos compatibles con una EET, y en los tejidos muestreados en la necropsia no se detectó PrP^{Sc} mediante técnicas convencionales. Sin embargo, se detectó una aparición de priones similares a la EEB durante la propagación *in vitro* de muestras de encéfalo de los animales inoculados. Estos hallazgos sugieren que el scrapie atípico puede representar una fuente potencial de infección por EEB en el ganado bovino.

7.2. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio es determinar si la inoculación de un aislado de scrapie atípico podría inducir una enfermedad similar a la EEB en el ganado bovino.

7.3. MATERIAL Y MÉTODOS

7.3.1. Selección de animales

Se utilizaron cuatro terneras de raza Pirenaica de 10 meses de edad. Estos animales fueron adquiridos en una explotación ganadera situada en Letux, provincia de Zaragoza.

A su llegada al animalario del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, los animales se desparasitaron y se les realizó una valoración clínica inicial para constatar su buen estado de salud y la ausencia de signos clínicos de ninguna enfermedad. Después se mantuvieron alojados juntos en observación durante el proceso de adaptación a las instalaciones.

7.3.2. Inóculo utilizado

Para este estudio, se utilizó el inóculo PS152 (aislado de origen francés) que se preparó con el encéfalo de una oveja en fase clínica e infectada con scrapie atípico de forma natural, de

genotipo AfRQ/AfRQ. Este aislado fue proporcionado por UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes, École Nationale Vétérinaire de Toulouse.

7.3.3. Procedimiento experimental con los animales

Todos los procedimientos experimentales realizados con los bovinos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza con el código PI 13/10. El cuidado y uso de los animales se realizó de acuerdo con la Política Española de Protección Animal recogida en el RD 53/2013, que cumple con la directiva de la Unión Europea 2010/63/UE relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Los animales fueron inoculados bajo anestesia general con xilacina y ketamina. Antes de insertar el taladro, se realizó una incisión cutánea parasagital de 1 cm sobre el punto de inoculación para exponer el periostio. Se realizó un pequeño orificio en el cráneo utilizando un taladro dental colocado paramedialmente en la región medio frontal de la cabeza, en un ángulo de 90° con respecto a la pendiente rostro-caudal de la parte frontal del cráneo. El inóculo se inyectó en la corteza frontal mediante una aguja de 9 cm de largo (calibre 22).

Tras la inoculación, se suturó la incisión cutánea y los animales recibieron tratamiento antibiótico y analgésico intramuscular (bencilpenicilina procaína, 10 mg / kg) y (flunixina, 2,2 mg / kg). Todos los animales recibieron 1 ml del inóculo PS152, homogeneizado de encéfalo al 10% en solución salina estéril, por lo que cada animal recibió en total 0,1 g de tejido nervioso. (Tabla 20).

Tabla 20. Relación de bovinos inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico.

ID	NACIMIENTO	INOCULACIÓN	DÍAS INOCULACIÓN	MESES INOCULACIÓN
B-1	08/05/2009	17/03/2010	313	10,43
B-2	02/07/2009	17/03/2010	258	8,60
B-3	29/07/2009	17/03/2010	231	7,70
B-4	01/07/2009	17/03/2010	259	8,63

7.3.4. Vigilancia y valoración clínica

Tras la infección experimental, los cuatro animales se mantuvieron juntos y alojados en el animalario del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Se les realizó una observación diaria por parte del personal cuidador en el momento de administrar la alimentación y tres veces por semana por el personal investigador, durante toda la duración del experimento. Una vez al mes se realizó una monitorización clínica más completa enfocada a detectar cualquier signo clínico compatible con una enfermedad priónica.

Alguno de los signos que se esperaban encontrar son los detectados por otros autores en infecciones experimentales por otras cepas priónicas como cambios de comportamiento,

depresión, hiperreacción a estímulos, confusión, ataxia, y posiciones anómalas de cabeza y orejas (Hedman et al., 2016).

7.3.5. Recogida de muestras y tejidos de los animales

Al finalizar el experimento los animales fueron eutanasiados mediante inyección intravenosa con pentobarbital sódico, seguido de desangrado sin mostrar signos clínicos de enfermedad priónica. El animal B-1 fue sacrificado debido al compromiso de su bienestar tras el desarrollo de una infección podal. Los demás animales fueron sacrificados de forma electiva para comprobar la evolución de la enfermedad.

Previamente a la eutanasia se realizó una toma de muestras de sangre, con el fin de obtener, suero, plasma, sangre entera y células blancas. Inmediatamente después de la eutanasia se realizó una necropsia completa y sistemática del animal, en la que se recogieron muestras de los siguientes órganos y tejidos:

SNC: Corteza frontal, telencéfalo, diencéfalo, hipotálamo, corteza occipital, hipocampo, mesencéfalo, puente, cerebelo, médula oblonga (óbex), medula espinal cervical, médula espinal torácica y médula espinal lumbar.

SNP: Ganglio del trigémino, nervio braquial, nervio ciático, ojo y músculos exoculares.

SLR: Linfonodos mediastínico, mesentérico, retrofaríngeo, submandibular, preescapular, precural, poplíteo e iliaco; bazo, placas de Peyer y amígdalas.

TGI: esófago, estómago, duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto.

Otros órganos: Pulmón, corazón, hígado, páncreas, músculos tríceps braquial y bíceps femoral, piel de la extremidad posterior a nivel del muslo, riñón, glándula adrenal, vejiga, útero y ovarios.

Todas las muestras se recolectaron por duplicado, una muestra se fijó en formol al 10% para estudios histológicos y la otra muestra se almacenó congelada a -80 °C para ensayos bioquímicos.

Además, se recogió adicionalmente un grupo de muestras utilizando material y equipos estériles libres de priones, para realizar bioensayos o técnicas de amplificación *in vitro* (corteza frontal, diencéfalo, corteza occipital, cerebelo, médula oblonga, nervio braquial, nervio ciático, músculos exoculares, bazo, linfonodo mesentérico y placa de Peyer). Estas muestras también se almacenaron a -80ºC hasta su utilización.

7.3.6. Estudio histopatológico e inmunohistoquímico

Las muestras recogidas en formol, se mantuvieron durante 48 horas para una correcta fijación y posteriormente se tallaron e incluyeron en parafina siguiendo el procedimiento histopatológico estándar (anexo 1). Se cortaron secciones de 4 µm de espesor usando un micrótomo y se montaron en portaobjetos de vidrio. Uno de los cortes se tiñó con hematoxilina-eosina para su estudio histopatológico (anexo 7).

Otro de los cortes se procesó mediante la técnica de Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc}. Esto se llevó a cabo mediante el protocolo de la técnica descrito en el anexo 2. Se realizaron una serie de pretratamientos para el desenmascaramiento de epítopos con ácido fórmico, proteinasa K y autoclavado hidratado. Posteriormente se realizó la incubación utilizando los anticuerpos primarios monoclonales L42 y 6H4 (Biopharm, Darmstadt, Alemania) (Hedman et al., 2012; Korth et al., 1997).

7.3.7. Detección de PrP^{Sc} mediante la técnica ELISA

A partir de las muestras recogidas en la necropsia y guardadas en congelación a -80ºC, se realizó una técnica de diagnóstico ELISA mediante el kit de IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (anexo 3). Las muestras empleadas fueron diferentes secciones del SNC, concretamente corteza frontal, tálamo, óbex y cerebelo. De cada una de estas muestras se tallaron 0,3 g y se realizaron 2 ciclos de trituración, dejando enfriar los homogeneizados entre ciclos. El punto de corte aplicado fue el establecido por los fabricantes del kit diagnóstico para tejido nervioso en bovinos, concretamente 0,14 unidades de absorbancia.

Como controles positivos para esta técnica, además de los suministrados por el kit, se añadieron corteza frontal, tálamo, cerebelo y óbex de una oveja positiva a scrapie atípico y óbex de una vaca positiva a EEB.

7.3.8. Detección de PrP^{Sc} mediante WESTERN BLOT

Se realizó la técnica de Western Blot para la detección de PrP^{Sc} a partir de muestras de corteza frontal, tálamo, cerebelo y óbex de las cuatro vacas inoculadas y de dos vacas sin ninguna EET de 11 y 12 años respectivamente, que se utilizaron como controles negativos.

Para ello, se mezclaron 20 µl de muestra con 180 µl de homogeneizado de cerebro de oveja negativa al 10% (Lacroux et al., 2012). Luego, se utilizó el kit TeSeE Western blot (Bio-Rad, Francia) siguiendo las recomendaciones del fabricante para realizar la extracción de PrP^{Sc}. Las muestras se sometieron posteriormente a electroforesis en SDS/PAGE al 12% y se transfirieron a membranas de Polifluoruro de Vinilideno (PVDF).

Después de bloquear la membrana durante 30 minutos en PBST + BSA al 2%, se realizó la inmunodetección de PrP^{Sc} con los anticuerpos monoclonales 12B2 (mAb 1:10000, CreativeBiolabs) y Sha31 (mAb, 1:8000, SPI-Bio). Se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (1:5000; Bio-rad) y un sustrato ECL (Pierce) para revelar la actividad de la peroxidasa (anexo 6).

7.3.9 amplificación de PrP^{Sc} mediante PMCA

Con las muestras de corteza frontal, tálamo, cerebelo y óbex de las cuatro vacas inoculadas y de dos vacas sin ninguna EET de 11 y 12 años respectivamente, que se utilizaron como controles negativos, se realizó la técnica de PMCA.

Para ello, se prepararon homogeneizados (10% en solución salina) de las citadas áreas del encéfalo de cada uno de estos animales. Posteriormente, cada homogeneizado se diluyó 1/50 para preparar las semillas de PMCA. Dichas semillas se sometieron a tres rondas (24 h cada una) de PMCA (Lacroux et al., 2012). En cada una de estas rondas se mezclaron 5 µl de semilla y 45 µl de sustrato por pocillo en una microplaca de PCR de 96 pocillos (AxygenScientific, EE. UU.). A cada pocillo se añadió una perla de teflón (2.381 mm de diámetro). La amplificación se realizó en un sonicador Qsonica Q700, utilizando un sistema de recirculación de agua. Luego, las microplacas se sometieron a 96 ciclos de sonicación de 10 s (75 % de potencia) seguidos de un período de incubación de 14 min y 50 s a una temperatura de 39,5 °C.

Después de cada ronda de PMCA (24h), se agregaron 5 µl del producto de reacción a una nueva microplaca que contenía 45 µl de sustrato fresco y se realizó una nueva ronda con 96 ciclos de sonicación e incubación. Como sustrato, se utilizó un homogeneizado de encéfalo de ratones TgBov, los cuales sobreexpresan aproximadamente 8 veces la PrP bovina (Castilla et al., 2003; Douet et al., 2014), diluido al 10% en buffer de PMCA (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 5 mM EDTA, 300 mM NaCl, 1% Triton X-100) y suplementado con una concentración final del 0,25% de dextrano de bajo peso molecular (Sigma-aldrich, D4911-10G molwt 6500/10000). Se seleccionaron los ratones TgBov como sustrato para la PMCA ya que los bovinos son los huéspedes naturales de la EEB y, por lo tanto, este modelo podría imitar correctamente la transmisión de priones de la EEB en condiciones naturales. Se utilizó sustrato sin semilla como control negativo y el control positivo se realizó con un homogeneizado de C- EEB diluido desde la dilución 10^{-1} a la 10^{-8} (anexo 8).

La detección de la PrP^{Sc} después de la PMCA se realizó mediante Western Blot. Antes del Western Blot, se realizó un ensayo de proteína BCA (ácido bicincochínico) (23227, ThermoScientific™) para determinar la concentración de las muestras y en cada pocillo se cargaron cantidades iguales de proteína. La proporción relativa de las 3 bandas de PrP^{Sc} de los productos de PMCA resultantes y de 6 controles de C-BSE se determinó usando el software Image J (anexo 6).

7.4. RESULTADOS

7.4.1. Valoración clínica

Las observaciones periódicas realizadas a los cuatro animales sometidos a inoculación intracerebral con scrapie atípico no revelaron en ningún momento signos clínicos neurológicos compatibles con el padecimiento de una EET. Tampoco presentaban signos clínicos neurológicos en el momento de la eutanasia. Sin embargo, el animal B-1 desarrolló patologías concomitantes, concretamente una dermatitis podal difusa o laminitis, que acabó afectando al estado general del animal y fue eutanasiado cuando su bienestar se vio comprometido. Los demás animales fueron sacrificados de forma electiva para comprobar la evolución de la enfermedad (Tabla 21).

Tabla 21. Relación de bovinos inoculados intracerebralmente con scrapie atípico, causa y fecha de la eutanasia.

ID	F. INOCULACIÓN	F. EUTANASIA	INT. INOC-EUT (AÑOS)	MOTIVO EUTANASIA
B-1	17/03/2010	03/12/2020	10,7	LAMINITIS
B-2	17/03/2010	19/01/2018	7,8	ELECTIVO
B-3	17/03/2010	03/02/2022	11,9	ELECTIVO
B-4	17/03/2010	03/02/2022	11,9	ELECTIVO

7.4.2. Métodos clásicos de detección de la PrP^{Sc}

Tras la tinción de hematoxilina-eosina de todos los tejidos recogidos en formol, se realizó una observación detallada al microscopio óptico de todas las muestras del SNC, para detectar la posible presencia de los cambios espongiformes característicos de estas enfermedades. En ninguna de las regiones encefálicas estudiadas se pudo observar esta lesión histopatológica.

También se observaron al microscopio óptico los cortes histológicos resultantes de la técnica de IHQ, y no se pudo evidenciar acumulación de PrP^{Sc} en ninguna de las áreas del SNC, ni del resto de tejidos recogidos de los animales.

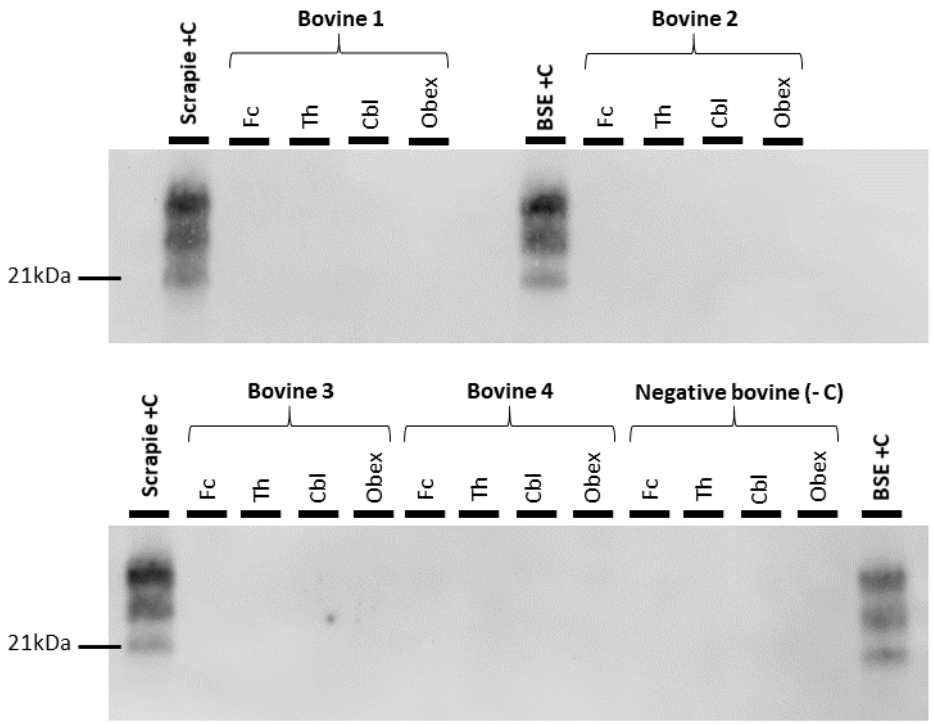


Figura 17. Resultados negativos de la técnica de diagnóstico Western Blot utilizando el anticuerpo Sha31 de cuatro áreas del encéfalo de las cuatro vacas inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico. Corteza frontal (Fc), tálamo (Th), cerebelo (Cbl) y óbex. Como control positivo se incluye encéfalo de una oveja infectada con scrapie clásico y de una vaca infectada con EEB.

Respecto a la técnica ELISA, con la cual se testaron corteza frontal, tálamo, cerebelo y óbex de los cuatro animales, ninguna de las muestras ofreció un resultado mayor de 0,14, por lo cual fueron consideradas negativas. Se detectó positividad en las 4 zonas del encéfalo procedentes de una oveja positiva a scrapie atípico y en el óbex de una vaca positiva a EEB.

Tampoco arrojó ningún resultado positivo la técnica de Western Blot realizada con el encéfalo de todos los animales, para detectar proteína prion (Figura 17).

7.4.3. Resultados PMCA

Las siguientes muestras de encéfalo: corteza frontal, tálamo, cerebelo y óbex de las cuatro vacas inoculadas se sometieron a PMCA para determinar si los priones de la EEB-C podían surgir a partir de vacas inoculadas con scrapie atípico. Se incluyeron muestras de encéfalo de vacas negativas de la misma edad como control de la generación espontánea de priones *in vitro*.

Cada área del encéfalo se probó por duplicado. Después de la propagación *in vitro*, se detectó amplificación de PrP^{Sc} en reacciones sembradas con material de SNC de 3 de las 4 vacas inoculadas con scrapie atípico, en las áreas de la corteza frontal, el tálamo y/o el cerebelo. Se detectó positividad en muestras de tálamo y cerebelo del bovino 1, muestras de corteza frontal y cerebelo del bovino 2, y muestras de corteza frontal y tálamo del bovino 3. No se detectaron reacciones positivas en los productos de reacción de PMCA del encéfalo de la vaca control negativo. Ninguna de las muestras de óbex mostró amplificación de PrP^{Sc} (resultados no mostrados).

El patrón de glicosilación de las reacciones positivas de PMCA observadas en Western Blot usando el anticuerpo Sha31 se caracterizó por un predominio de la banda diglicosilada y una banda no glicosilada a 19 kDa. No se detectó PrP^{res} cuando se utilizó el anticuerpo 12B2 (Figura 18). Las bandas observadas son características e indistinguibles de las de los priones de C-EEB y de las de los productos de PMCA de reacciones sembradas con priones de C-EEB. Los duplicados de las muestras analizadas revelaron resultados idénticos cuando se analizaron mediante Western Blot (no se muestran los resultados).

El aislado de scrapie atípico PS152 utilizado para inocular a las vacas por vía intracerebral se sometió a PMCA en las condiciones descritas anteriormente (sustrato de TgBov suplementado con una concentración final de dextrano de bajo peso molecular al 0,25%). El inóculo se diluyó a 1/50 y luego se ensayó en PMCA por duplicado. Después de tres rondas de PMCA, Los productos se analizaron mediante Western Blot utilizando el anticuerpo Sha31 y se observó amplificación. Las muestras de PMCA sembradas con el inóculo original mostraron un patrón similar a la C-EEB, mostrando una banda no glicosilada de 19 kDa y una banda diglicosilada predominante (Figura 19). Por tanto, los productos de la PMCA del inóculo original PS152 presentaban un patrón de glicoformas indistinguible del de la EEB bovina y la EEB bovina propagada por PMCA.

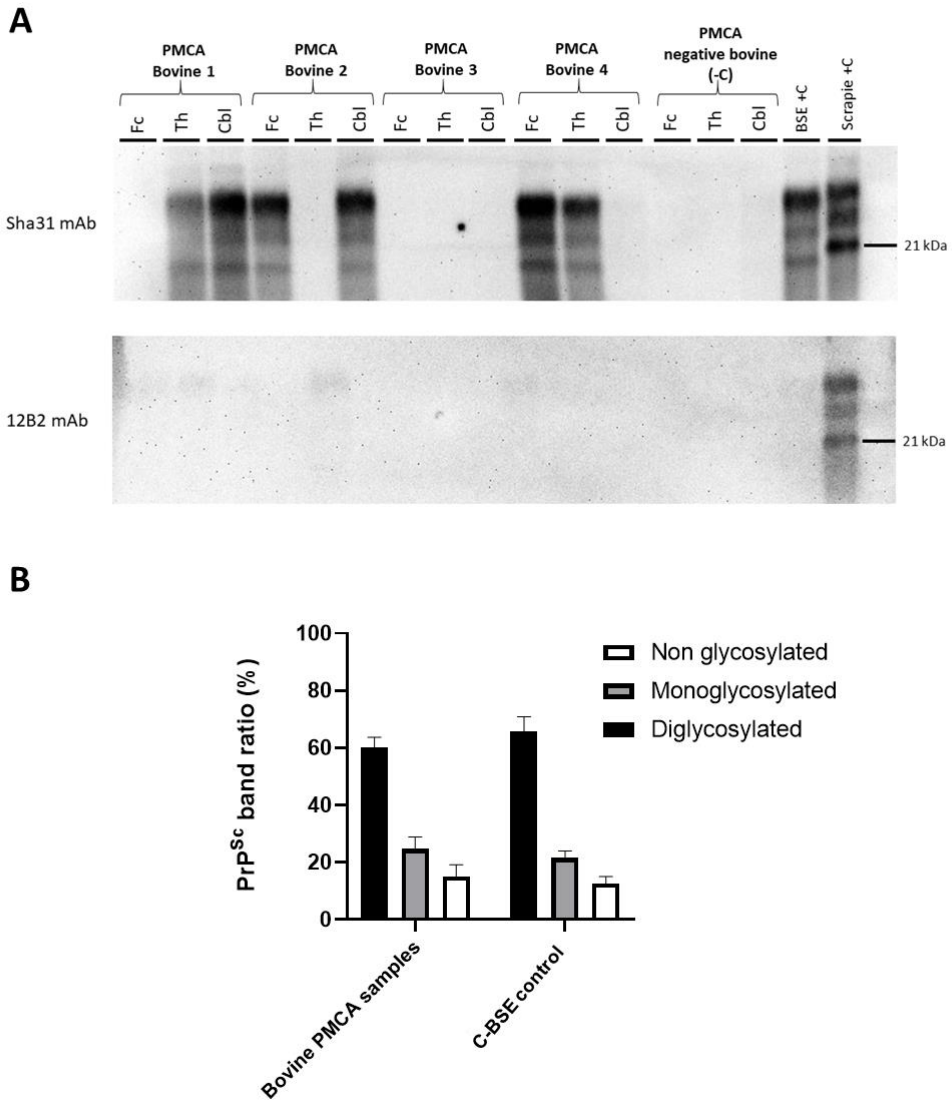


Figura 18. A. Resultados de la técnica de diagnóstico Western Blot utilizando el anticuerpo Sha31 y 12B2 de los productos de reacción PMCA de corteza frontal (Fc), tálamo (Th) y cerebelo (Cbl) de las cuatro vacas inoculadas vía intracerebral con scrapie atípico y una vaca control negativo. Como controles positivos se utilizaron un aislado de un encéfalo de una vaca con EEB clásica y un aislado de una oveja infectada con scrapie clásico. B. Las cantidades relativas de glicoformas diglicosiladas (barra negra), monoglicosiladas (barra gris) y no glicosiladas (barra blanca) de los productos PMCA sembrados con muestras del encéfalo de bovinos inoculados con scrapie atípico y seis controles de C-EEB se determinaron mediante el software Image J. Los resultados se presentan como media ± desviación estándar. No se observaron diferencias significativas en la cantidad relativa de glicoformas de PrP^{Sc} entre las muestras del estudio y los controles de C-EEB.

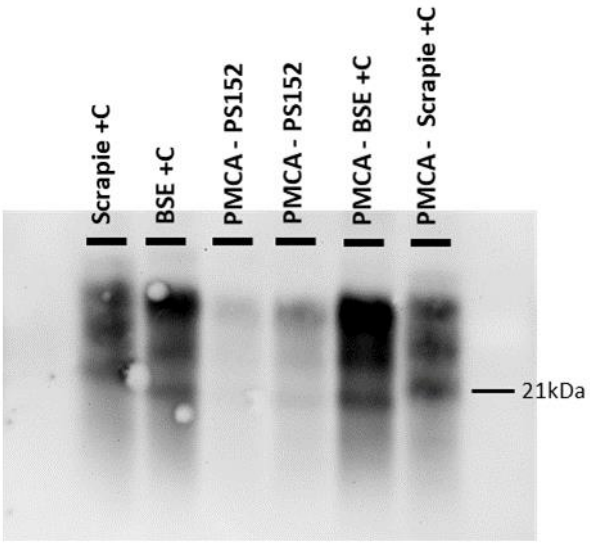


Figura 19. Resultados de la técnica de diagnóstico Western Blot, utilizando el anticuerpo Sha31, de los productos de reacción PMCA del inóculo de scrapie atípico PS152. Como control positivo se incluyen los productos de PMCA de una vaca con EEB clásica y una oveja con scrapie clásico propagadas en sustrato TgBov, un aislado de EEB clásica y un aislado de scrapie clásico.

7.5. DISCUSIÓN

Estudios anteriores han demostrado que los priones de la EEB clásica pueden estar presentes como una variante menor en aislados de scrapie atípico ovino y que pueden surgir durante el paso de estos aislados a cerdos y ratones que expresan la PrP bovina (Huor et al., 2019; Marín et al., 2021). Estos resultados apuntaron al scrapie atípico como posible origen de la EEB. Por lo tanto, este estudio tenía como objetivo evaluar el vínculo entre el scrapie atípico y la EEB en el huésped natural de esta enfermedad, el ganado bovino.

Aunque la inoculación intracerebral tiene algunas limitaciones y no refleja el proceso de transmisión natural de los priones, los bioensayos que utilizan la inoculación experimental de priones han permitido identificar y describir los mecanismos de transmisión de estos patógenos. Por lo tanto, se decidió inocular vacas, el huésped natural de la EEB, por vía intracerebral, con un aislado atípico de scrapie.

Al igual que sucedió en el estudio con los cerdos, ninguno de los animales de este experimento mostró signos clínicos de EET después de la inoculación con scrapie atípico. Además, la ausencia de cambios espongiformes, así como la ausencia de detección de PrP^{Sc} mediante técnicas convencionales como el Western Blot o la IHQ en el encéfalo de estos animales, resalta aún más la necesidad de técnicas altamente sensibles como la PMCA para detectar niveles bajos de priones.

Tras la propagación *in vitro* de muestras de encéfalo de las vacas incluidas en este estudio, se detectó amplificación de priones en reacciones sembradas con corteza frontal, tálamo y cerebelo de tres de las cuatro vacas. Curiosamente, no se observó propagación de priones con ninguna de las muestras de óbex, que es una de las zonas más afectadas por las enfermedades priónicas (Baldauf et al., 1997).

Es importante destacar que el patrón de glicosilación observado en las reacciones positivas por PMCA fue indistinguible del de los priones de C-EEB y de los productos PMCA de reacciones sembradas con priones de C-EEB. Para comprobar si los priones de la EEB clásica estaban presentes en el aislado original de scrapie atípico o si emergieron en el encéfalo de las vacas después de la inoculación, se realizó PMCA del inóculo original en sustrato TgBov, siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente. La amplificación *in vitro* del inóculo de scrapie atípico dio como resultado la propagación de priones bioquímicamente indistinguibles de la C-EEB o reacciones positivas de PMCA sembradas con muestras de encéfalo de las vacas inoculadas, lo que sugiere que, como se describió anteriormente, ciertos aislados de scrapie atípico contienen niveles bajos de priones de C-EEB (Huor et al., 2019).

Además, para descartar un plegamiento *in vitro* espontáneo de la PrP bovina durante la PMCA, se incluyó, como control de la técnica, muestras de encéfalo de vacas no inoculadas de la misma edad, que también fueron sometidas a propagación *in vitro* en serie con sustrato TgBov. No se observó amplificación de priones en las reacciones de PMCA sembradas con las muestras de estos animales, lo que sugiere una verdadera amplificación de priones similares a la C-EEB y no un plegamiento incorrecto *in vitro* espontáneo de la PrP bovina.

Recientemente, otro grupo de investigación, ha llevado a cabo un estudio similar de inoculación intracerebral en bovinos con homogeneizados procedente de ovejas infectadas con scrapie atípico y sus resultados coinciden totalmente con los nuestros, corroborando así la existencia de esa amplificación de priones de C-EEB mediante PMCA a partir de los encéfalos de dichos bovinos (Konold et al., 2023).

Aunque todos estos resultados sugieren la amplificación de priones similares a la C-EEB durante la transmisión del scrapie atípico ovino a las vacas, la posibilidad de que la PMCA detecte priones restantes del inóculo quedaría definitivamente descartada después de los bioensayos *in vivo* en líneas de ratón que expresan PrP bovina y ovina, que se están llevando a cabo actualmente.

Curiosamente, los intervalos de tiempo transcurridos entre la inoculación y la aparición de priones similares a la EEB en las muestras de encéfalo de los bovinos no estuvieron correlacionados. Como ya se ha indicado, la aparición de C-EEB a partir del scrapie atípico se ha asociado con la presencia de niveles bajos de priones de C-EEB en los aislados de scrapie atípico y nuestros resultados, después de la amplificación *in vitro* del inóculo PS152, respaldan esta teoría. Por lo tanto, es posible que el número de confórmeros de C-EEB contenidos en los aislados de scrapie atípico sea escaso y no esté distribuido de manera homogénea, lo que hace que las vacas durante la inoculación reciban diferentes cantidades de priones de la EEB.

Es cierto que la aparición de priones similares a la EEB en el encéfalo de las vacas de este estudio, podría estar relacionada con la persistencia de priones del inóculo original de scrapie atípico. Estudios anteriores, en los que se detectó propagación de priones en el encéfalo de ratones $PrP^{0/0}$ inoculados intracerebralmente, han puesto de relieve la capacidad de los priones para persistir en entornos no replicativos (Martin et al., 2021). Sin embargo, las vacas fueron inoculadas intracerebralmente en la corteza frontal y se detectó amplificación de priones de C-EEB en las regiones caudales de sus encéfalos, pero no en áreas más rostrales como la corteza frontal. Si estas reacciones positivas de PMCA no fueran una propagación genuina de priones similares a la C-EEB, sino que estuvieran asociadas a la persistencia del inóculo, se esperaría detectar dicha amplificación en las áreas más rostrales del cerebro.

La falta de signos clínicos de enfermedad priónica en las vacas después de la inoculación con scrapie atípico contrasta con los resultados de un estudio previo en el que ratones que expresan la PrP bovina (TgBov) fueron inoculados con aislados de scrapie atípico y mostraron signos de enfermedad priónica clínica, desarrollando características neuropatológicas de C- EEB (Huor et al., 2019). En dicho estudio, después del primer pase, sólo se observaron signos de enfermedad priónica en una proporción baja de los ratones inoculados, y varios de los aislados inoculados no produjeron acumulación de PrP^{Sc}. Se necesitaron tres pases seriados de scrapie atípico para observar tasas de ataque completas en ratones TgBov. Además, los ratones del primer pase que desarrollaron signos clínicos mostraron largos períodos de incubación considerando la esperanza de vida de un ratón. Las vacas en este estudio también fueron eutanasiadas después de un largo período post-inoculación (entre 7 y 11 años). Probablemente, el número de priones C-EEB presentes en el inóculo original de scrapie atípico era demasiado bajo para producir la enfermedad en las vacas en este primer pase. También hay que considerar que los ratones TgBov sobreexpresan 8 veces la PrP^{C} bovina, haciéndolos más susceptibles a desarrollar la enfermedad después de la inoculación de priones de C-BSE. Se han iniciado nuevos experimentos *in vivo,* inoculando diferentes líneas de ratones para confirmar la infectividad de los productos de PMCA obtenidos en este estudio.

En conclusión, nuestros hallazgos muestran que la propagación del scrapie atípico en el ganado bovino conduce a la aparición de priones similares a los de la C-EEB. Se trata de una cuestión preocupante con implicaciones de gran alcance para la salud pública y la seguridad alimentaria. La posibilidad de transmisión entre especies de enfermedades priónicas y la aparición de nuevas cepas de priones resaltan la necesidad crítica de una vigilancia y seguimiento continuos de estas enfermedades tanto en poblaciones animales como en el ser humano. La detección temprana de las enfermedades priónicas es crucial y las técnicas de detección altamente sensibles como la PMCA pueden desempeñar un papel importante a este respecto.

8. DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades priónicas o EET son enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a la especie humana como a distintas especies animales. A pesar de que algunas de ellas se conocen desde hace casi 300 años, muchos aspectos de los agentes etiológicos, patogenia, transmisión y diagnóstico de estas enfermedades están aún por resolver. La existencia de cepas de priones y de la barrera de transmisión entre especies es una característica de estas enfermedades que condiciona su transmisión tanto en condiciones naturales como experimentales.

El objetivo principal de esta tesis ha sido contribuir al conocimiento de la transmisibilidad y la infectividad del scrapie atípico, una de las EET con más relevancia en los últimos años, por su posible implicación en la generación de la EEB (Huor et al., 2019). Para ello, se han llevado a cabo infecciones experimentales de esta enfermedad en su especie hospedadora, la ovina, y en otras especies, como la bovina y la porcina.

En primer lugar, se ha realizado un estudio de la distribución de la proteína prion patológica asociada al scrapie atípico en la especie ovina, en animales infectados experimentalmente por vía intracerebral, valorándose si existía una diseminación de la enfermedad a otros tejidos y órganos además del SNC, así como la evolución clínica de la enfermedad en ovinos de diferente genotipo (estudio nº 1). Como segundo objetivo se han estudiado las placentas de las ovejas infectadas experimentalmente vía intracerebral con scrapie atípico, realizándose para ello un bioensayo en modelo murino (estudio nº 2). Con el mismo inóculo utilizado para la infección intracerebral, se han realizado inoculaciones por vía oral en la especie ovina, para valorar la posibilidad de que se produjera una infección en animales expuestos a dicho agente en condiciones naturales de granja (estudio nº 3). Por último, se ha realizado un estudio de la transmisibilidad del agente del scrapie atípico en diferentes especies, realizándose inoculaciones intracerebrales de este agente en las especies porcina (estudio nº4) y bovina (estudio nº 5).

En el caso de la inoculación intracerebral, la mayoría de los ovinos, de ambos genotipos, mostraron signos clínicos neurológicos asociados con la enfermedad del scrapie atípico, siendo la excepción un único animal que fue eutanasiado por otra patología antes de presentar sintomatología asociada a la enfermedad. Los signos clínicos, de tipo neurológico, fueron similares en los dos genotipos ensayados, principalmente caracterizados por déficits propioceptivos, ataxia, hipermetría y posturas anómalas. Estos resultados fueron consistentes con otros estudios de scrapie atípico experimental en ovejas de diferentes genotipos (Cassmann et al., 2021; Simmons et al., 2007; Simmons et al., 2010).

Como hecho diferencial, destacó una variabilidad en el periodo de incubación entre los animales del primer y segundo pase, indicando una posible adaptación de la cepa inoculada. Además, el genotipo ARR/AHQ presentó un periodo de incubación más largo en comparación con AHQ/AHQ, y la progresión de los signos clínicos fue significativamente más lenta, con una supervivencia en fase clínica de más de 3 años. Aunque es la primera vez que se realiza una

infección experimental en animales de este genotipo, los resultados son próximos a los de otro estudio realizado con animales de genotipo ARQ/ARR (Cassmann et al., 2021).

A pesar de las diferencias observadas en el periodo de incubación en animales infectados con distintos genotipos, la duración del curso de la enfermedad y la esperanza de vida de los animales clínicamente enfermos, así como las manifestaciones clínicas observadas en animales que presentan scrapie atípico, parecen ser independientes del genotipo.

Se analizaron los depósitos de PrP^{Sc} en el encéfalo de los animales objeto de estudio, mediante la técnica de IHQ, observando una distribución comparable a otros estudios de scrapie atípico, observándose la mayor presencia de la proteína patológica en el cerebelo y de baja intensidad en el óbex (Benestad et al., 2003; Moore et al., 2008; Simmons et al., 2007). Esto corrobora que el óbex no es el sitio óptimo para confirmar la presencia de PrP^{Sc} durante la fase inicial del scrapie atípico. Además, se observó un perfil de depósito muy similar en todos los animales del estudio, que indica la gran similitud en la neuropatología observada en los casos atípicos, independientemente del genotipo, y que está en concordancia con lo observado por otros autores (Benestad et al., 2003; Gavier-Widén et al., 2005; Moore et al., 2008; Onnasch et al., 2004).

En contraste con los casos de scrapie clásico (Cassmann et al., 2021), no se detectó presencia de PrP^{Sc} en tejidos linfoides ni periféricos. Sin embargo, sí que se encontró positividad en SNP, concretamente en bulbo olfatorio, nervio óptico y retina en animales de ambos genotipos. La presencia de PrP^{Sc} en la retina se detectó en las capas plexiforme externa e interna, con ausencia de depósitos en las células ganglionares, que se describen como positivas en casos de scrapie clásico (Hortells et al., 2006). Estos resultados sugieren la necesidad de investigaciones adicionales en este área, ya que se observa variabilidad en la literatura respecto a este hallazgo, encontrándose trabajos que han detectado resultados similares a los del presente estudio (Cassmann et al., 2021), mientras que, en el resto de trabajos consultados, no se informa de este hallazgo en retina (Benestad et al., 2003; Kittelberger et al., 2010; Matsuura et al., 2019; Okada et al., 2016; Simmons et al., 2007).

En otros trabajos de ovinos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico, se ha señalado la infectividad de ciertos tejidos periféricos al inocularse en ratones ovinizados, a pesar de la falta de depósito detectado por IHQ (Andreoletti et al., 2011). Esto hace necesario seguir investigando en este campo y realizar estudios complementarios de infectividad, antes de asegurar la ausencia total de la PrP^{Sc} en estos tejidos.

Debido a la conocida importancia de la placenta como transmisora del scrapie clásico dentro de los rebaños ovinos, incluso en fase preclínica de la enfermedad (Andréoletti et al., 2002; Tuo et al., 2002), se decidió iniciar esos estudios complementarios de infectividad a partir de este tejido. Se analizaron las placentas de los animales afectados de scrapie atípico mediante las técnicas de ELISA e IHQ, con un resultado negativo. Posteriormente, para valorar su infectividad, se realizó un bioensayo en modelo murino Tg338 que sobreexpresa el gen PrP ovino, y los encéfalos de los ratones inoculados se analizaron con diferentes técnicas de detección de PrP^{Sc}.

Las técnicas de detección de PrP^{Sc} convencionales utilizadas en los encéfalos de los ratones tampoco mostraron presencia de priones en los encéfalos murinos, lo que estaría en concordancia con la ausencia de detección de esta proteína infecciosa en las placentas recogidas.

Sin embargo, tras la realización de la técnica de amplificación de priones, PMCA, utilizando como sustrato encéfalo de ratones Tg338 que sobreexpresan la PrP ovina, los resultados difirieron significativamente de los obtenidos inicialmente, ya que todos los encéfalos murinos analizados mostraron amplificación de PrP^{Sc} mediante Dot Blot. El uso de Western Blot confirmó estos resultados, revelando un perfil de glicosilación coincidente con el scrapie clásico. Sorprendentemente, el control positivo de ratones inoculados con un aislado de scrapie atípico también mostró priones con características bioquímicas idénticas. Estos resultados plantean el interrogante de si los priones del scrapie clásico estaban presentes en el aislado original de scrapie atípico, o si emergieron después de la inoculación en ratones Tg338.

La coexistencia de distintas cepas priónicas en un mismo individuo se ha observado en numerosas ocasiones en el scrapie clásico (Barrio et al., 2020; Bruce et al., 2002; Thackray et al., 2011; Thackray et al., 2012). Por su parte, la emergencia de priones de C-EEB a partir de aislados de scrapie atípico, como se ha descrito en estudios anteriores (Huor et al., 2019), sugiere que podrían existir niveles bajos de confórmeros de scrapie clásico en los aislados de scrapie atípico, detectables solo mediante técnicas ultrasensibles.

Aunque en el scrapie clásico, la placenta es una vía importante de excreción de priones, contribuyendo a la contaminación ambiental y a la transmisión horizontal de la enfermedad, la aparente falta de PrP^{Sc} en las placentas de scrapie atípico sugerirían un bajo riesgo de transmisión natural a través de este tejido, concordando estos hallazgos con investigaciones recientes que indican que el scrapie atípico, en ese caso en animales ARR/ARR, parece ser una enfermedad no transmisible en condiciones naturales, con el agente etiológico confinado al SNC (Piel et al., 2022).

Sin embargo, los resultados mostrados tras la amplificación de priones mediante PMCA, cuestiona esta falta de transmisión a través de la placenta, y hace necesario un estudio más profundo, mediante un segundo pase en el mismo modelo murino, y la realización de nuevas pruebas de diagnóstico ultrasensibles a partir de las placentas de ovejas infectadas con scrapie atípico. Los resultados en curso ayudarán a determinar de manera más precisa la presencia de PrP^{Sc} en las placentas, incluso en cantidades mínimas, y evaluarán el riesgo potencial de contaminación ambiental y transmisión entre animales, especialmente preocupante, ya que estos priones podrían encontrarse en la placenta antes de que los animales mostraran síntomas clínicos de la enfermedad.

Para simular la transmisión natural del scrapie atípico, se realizó un estudio de inoculación oral, utilizando el mismo inóculo, genotipos y raza de ovinos que en el experimento de la inoculación intracerebral de scrapie atípico, como alternativa para estudiar la enfermedad adquirida de forma natural. Se utilizaron 13 animales de genotipos AHQ/AHQ y ARR/AHQ, que se

mantuvieron asintomáticos hasta la eutanasia, realizada entre los 3,7 y los 10,7 años tras la infección experimental.

De nuevo, se utilizaron en primer lugar técnicas convencionales de diagnóstico de las enfermedades priónicas, como son el ELISA y la IHQ con el Ac 8G8 que ha sido probado en numerosos experimentos como el que mejor reconoce la presencia de la proteína prion patológica en los casos de scrapie atípico (Andreoletti et al., 2011). Tras obtener resultados negativos en ambas técnicas, se realizó la PMCA con los encéfalos de los animales inoculados. En este caso, se observó una amplificación de priones en la muestra de uno de los animales al sembrarla con sustrato de ratones TgBov, que amplifican la PrP bovina. Además, mediante Western Blot, se evidenció que los priones amplificados tenían un perfil de glicosilación similar al de la EEB. Este resultado sorprendente plantea la posibilidad de que, de haber desarrollado la enfermedad, sería bioquímicamente más similar a la EEB que al scrapie atípico, con implicaciones potenciales para la salud pública. Esta idea se respalda con estudios que sugieren al scrapie atípico como el posible origen de la EEB (Huor et al., 2019).

Aunque hay numerosos estudios de transmisión con éxito del scrapie atípico mediante inoculación intracerebral (Cassmann et al., 2021; Okada et al., 2016; Piel et al., 2022; Simmons et al., 2007; Simmons et al., 2010), solamente en uno de ellos se utiliza la transmisión oral de esta enfermedad, utilizándose animales de genotipo AHQ/AHQ, de menor edad que los ensayados en nuestro experimento, y empleando dosis de inoculación más altas (Simmons et al., 2011). Estas diferencias en la metodología, así como el uso de razas ovinas diferentes, podrían ser las responsables de los diferentes resultados obtenidos.

Probablemente el principal factor diferencial sea la dosis de encéfalo administrada, siendo en el caso de nuestro estudio una única dosis de 1,5 gramos de tejido del encéfalo, que podría estar por debajo del umbral necesario para lograr la infección. En el estudio de Simmons y colaboradores de 2011, los animales recibieron por vía oral dos dosis con 2,5 gramos de homogeneizado de encéfalo de un animal positivo.

Existen otros estudios de inoculación oral, de otras enfermedades priónicas, en pequeños rumiantes en los que se han utilizado diferentes pautas de administración, generalmente basadas en la utilización de una o dos dosis infecciosas masivas (comúnmente 5 g de material encefálico) (Andréoletti et al., 2004; Bellworthy et al., 2005; Foster et al., 2001). Sin embargo, en los animales infectados por vía natural, probablemente ocurra tras haber estado expuestos a cargas infecciosas bajas repetidas, a partir de numerosas fuentes potenciales de contaminación, como anexos fetales (Andréoletti et al., 2002), calostro, leche (Konold et al., 2008; Lacroux et al., 2008) o incluso el entorno, en lugar de a una o dos dosis masivas.

También podría ser determinante la edad, ya que Simmons y colaboradores administraron la primera dosis de inóculo a los animales antes de las 24 horas de vida y en nuestro estudio la administración se llevó a cabo en animales de 3 o 4 meses de vida. Se conoce que con la edad, disminuye la susceptibilidad de los animales a la infección por vía oral, natural y experimental al scrapie clásico, debido a la involución del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) (St Rose et

al., 2006), y se ha demostrado que la mucosa intestinal neonatal permite el paso relativamente libre de moléculas de proteína (p. ej., inmunoglobulinas y otras) desde el contenido luminal hacia el sistema linfático hasta 24 horas después del nacimiento. Se han realizado experimentos de inoculación oral con scrapie clásico en ovinos de diferentes edades y los animales de menor edad muestran tasas de ataque más altas, y se requiere menor dosis de inóculo para inducir la enfermedad, en relación a animales mayores (Hamir et al., 2009).

La diferente patogenia del scrapie clásico y atípico impide poder extrapolar los resultados obtenidos en los estudios de infección experimental oral con scrapie clásico y plantea la necesidad de realizar nuevas infecciones experimentales por vía oral de scrapie atípico utilizando animales de diferentes edades para estudiar la evolución de la susceptibilidad de acuerdo a este parámetro.

Transcurridos más de 10 años tras la inoculación, se decidió finalizar el experimento. Debido a la ausencia de PrP^{Sc} detectable en SNP en el caso del scrapie atípico, el diagnóstico *in vivo* mediante biopsias no era posible para detectar infección subclínica y se decidió eutanasiar los últimos animales a pesar de encontrarse en buen estado de salud, ya que estaban por encima de la esperanza de vida de estos animales en cualquier sistema de producción.

Dado que diferentes trabajos han detectado infectividad en tejidos de animales inoculados con scrapie atípico, a pesar de no haber detectado la presencia de la PrP^{Sc} mediante técnicas convencionales como ELISA, IHQ o Western Blot (Andreoletti et al., 2011), y especialmente tras el resultado obtenido en la PMCA, se hace imprescindible realizar un estudio de bioensayo con los tejidos del SNC de estas ovejas. El resultado obtenido tras la PMCA parece indicar que, al menos en esa oveja, los priones podrían haber alcanzado el SNC, a partir de la inoculación oral, aunque en pequeña cantidad, lo que explicaría el motivo por el cual esos animales permanecían asintomáticos, y porqué el resto de técnicas de detección priónica empleadas no detectaron estos priones. El experimento de bioensayo está actualmente en curso, utilizándose ratones Tg338, que sobreexpresan la variante VRQ/VRQ de la PrP ovina, y ratones transgénicos TgBov que sobreexpresan PrP bovina. El bioensayo ayudará a determinar si los tejidos de estos animales podrían transmitir la infección a otros animales o incluso a humanos a través de la cadena alimentaria, especialmente preocupante si los priones evolucionaran hacia una EEB.

Aunque históricamente el scrapie atípico se considera no transmisible en condiciones naturales, y carece de algunas medidas de control, diferentes estudios indican cambios fenotípicos que sugieren posibles conexiones con el scrapie clásico (Simmons et al., 2015) y la EEB (Huor et al., 2019). Aunque no hay evidencia epidemiológica de propagación eficiente en el campo, existe la posibilidad de una propagación forzada, especialmente con altas dosis a través de la alimentación animal si se flexibilizan las restricciones actuales, por lo cual, la continuación de la investigación sobre sus vías de transmisión es crucial.

En esta tesis también se ha querido investigar la transmisibilidad del scrapie atípico a dos especies fundamentales en la cadena alimentaria, como son el ganado porcino y bovino, ya que

esta circunstancia podría tener importantes implicaciones para la seguridad alimentaria y la salud pública.

A pesar de la aparente resistencia de los cerdos a las EET, dado que nunca ha sido descrita ninguna enfermedad priónica natural en esta especie, investigaciones experimentales en cerdos y ratones transgénicos que expresan la proteína priónica porcina han revelado que, aunque los cerdos presentan una fuerte barrera de transmisión, no son completamente resistentes a ciertos priones (Castilla et al., 2004; Espinosa et al., 2009; Hedman et al., 2016). Se ha detectado infectividad en tejidos de cerdos inoculados por vía oral con scrapie clásico o ECC de los cérvidos (Greenlee et al., 2016; Moore et al., 2017), a pesar de ser animales subclínicos, lo que podría suponer un grave problema de salud pública, ya que estos animales no se considerarían sospechosos y llegarían a matadero y a la cadena alimentaria humana.

En este trabajo se probó la capacidad del scrapie atípico de propagarse en cerdos, ya que, en un estudio previo, se había propagado esta enfermedad priónica a ratones transgénicos TgPo, ratones que expresan la PrP porcina, con un resultado en la tasa de ataque del 100% y cortos periodos de incubación tras la adaptación de esta cepa de scrapie a la línea TgPo mediante pases seriados (Espinosa et al., 2009). Sin embargo, un estudio posterior, muy similar a este, de propagación de este aislado atípico de scrapie en ratones TgPo, junto con otros aislados de scrapie atípico, no se obtuvieron resultados positivos, ni *in vitro* ni *in vivo* (Espinosa et al., 2021), lo que refuerza la teoría de que la especie porcina es altamente resistente al scrapie atípico.

Los cerdos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico de este estudio no mostraron ningún signo clínico y fueros eutanasiados entre los 22 y 72 mpi. En los tejidos de estos animales no se evidenció presencia de PrP^{Sc} mediante IHQ, ELISA o WB. Otros trabajos detectaron acumulación de PrP^{Sc} en cerdos expuestos a EEB a los 34 mpi (Wells et al., 2003), y a los 22 mpi cuando se inocularon con EEB ovina (Hedman et al., 2016). En cerdos inoculados con scrapie clásico se detectó presencia de PrP^{Sc} a los 51 mpi (Greenlee et al., 2016) y a los 6 mpi, en el caso de los animales inoculados con ECC de los cérvidos (Moore et al., 2017).

Con las muestras recogidas del SNC de los porcinos se realizó un bioensayo en ratones TgPo con resultado negativo, sin embargo, solo se realizó un pase en estos ratones por lo que podría ser interesante realizar más pases en esta línea y/o analizar mediante PMCA los encéfalos de los ratones para detectar cualquier posible replicación de priones.

En un estudio reciente (Huor et al., 2019), se evidenció la presencia de priones de la C-EEB como variante menor en aislamientos de scrapie atípico ovino y se descubrió que la C-EEB podía desarrollarse al transmitir estos aislamientos a ratones con la proteína PrP bovina. Dado que el scrapie atípico ovino, al transmitirse a ratones TgPo, adquirió propiedades similares a la EEB (Espinosa et al., 2009), y la EEB clásica es el único prion que se propaga eficientemente en la PrP porcina (Wells et al., 2003; Hedman et al., 2016; Espinosa et al., 2021), se decidió investigar la posibilidad de que los priones de la EEB clásica surgieran del scrapie atípico durante la transmisión entre ovejas y cerdos.

Para ello se realizó la técnica de PMCA con el encéfalo de los porcinos inoculados, utilizando sustrato de ratones TgBov. Sorprendentemente, las reacciones de PMCA de siete de estos animales, mostraron PrP^{res} con características bioquímicas idénticas a las de la EEB clásica. Los resultados positivos se observaron en cerdos inoculados con los aislados de scrapie atípico PS152 y TOA3, con periodos mínimos de incubación de 28 y 35 meses respectivamente. No todas las áreas del encéfalo analizadas en cada animal mostraron reacciones positivas. Estos resultados podrían sugerir que los priones de la C-EEB emergieron durante la transmisión de priones de scrapie atípico ovino a los cerdos. Curiosamente, los priones de EEB no emergieron del encéfalo de todos los cerdos y, de aquellos de los que sí surgieron, no se detectaron en todas las áreas del analizadas. Tampoco se encontró correlación entre el tiempo tras la inoculación y la aparición de la EEB. Todo esto sugiere la necesidad de realizar más bioensayos en ratones TgBov para determinar si estos priones replican las características neuropatológicas de la EEB.

Es posible que este resultado esté relacionado con la gran resistencia que presentan los cerdos a las enfermedades priónicas, haciendo incompleta la penetración de los priones de la EEB que pudieran estar presentes en el inóculo original. También es posible que no todos los animales recibieran una cantidad suficiente de confórmeros de EEB clásica capaces de ser detectados por PMCA, ya que, probablemente la cantidad de estos confórmeros en los inóculos de scrapie atípico sea muy reducida y no estén distribuidos de manera homogénea por todo el inóculo.

Esta presencia inconstante de los priones de EEB clásica en los encéfalos de los porcinos también podría ser debida a la persistencia de estos priones en el inóculo original de scrapie atípico. Sin embargo, en alguno de los animales se detectó propagación de EEB en regiones caudales del encéfalo (cerebelo o corteza occipital) pero no en más áreas rostrales (como la corteza parietal), que fue la zona de inyección del inóculo.

Los hallazgos de este estudio sugieren que, aunque los cerdos presentan una fuerte barrera de transmisión contra la propagación del scrapie atípico, pueden propagar niveles bajos de priones de la EEB. La posibilidad de transmisión de una EET a los cerdos es un tema crítico de salud pública debido al gran consumo de carne de cerdo y al uso creciente de este animal como donante de tejidos, como se evidenció en un caso de vCJD en un paciente que recibió un injerto de duramadre porcina (Heath et al., 2006).

Partiendo de la hipótesis de que el scrapie atípico pudiera haber sido el origen de la EEB, se planteó el siguiente objetivo de evaluar la conexión entre el scrapie atípico y la EEB en el ganado bovino, el hospedador natural de esta enfermedad y para ello se inocularon vacas intracerebralmente con un aislado de scrapie atípico, ya que los bioensayos son una herramienta útil para identificar y describir los mecanismos de transmisión de estos agentes patógenos.

Al igual que ocurrió en los cerdos, ningún animal de este experimento mostró signos clínicos neurológicos tras la inoculación con scrapie atípico. Y en el estudio de sus encéfalos tras la eutanasia no se detectaron cambios espongiformes, ni presencia de PrP^{Sc} mediante técnicas convencionales, como Western Blot o IHQ. Así que, se recurrió a técnicas altamente sensibles, como la PMCA, para detectar niveles bajos de priones y tras la realización de esta técnica se

detectó amplificación de priones en corteza frontal, tálamo y cerebelo de tres de las cuatro vacas estudiadas. Curiosamente, no se observó propagación de priones con ninguna de las muestras de óbex, que es una de las zonas más afectadas por las enfermedades priónicas (Baldauf et al., 1997).

Esta falta de signos clínicos en las vacas inoculadas con agentes del scrapie atípico, contrasta con los resultados de un estudio previo en el que ratones TgBov inoculados con aislados de scrapie atípico, mostraron signos de enfermedad priónica clínica, tras el primer pase, y desarrollaron características neuropatológicas de C- EEB (Huor et al., 2019). Sin embargo, el periodo de incubación de estos animales clínicos fue superior a la esperanza de vida de esta especie, y se necesitaron tres pases para observar tasas de ataque del 100% en ratones TgBov. Las vacas de nuestro estudio fueron eutanasiadas entre los 7 y 11 años después de la inoculación, es decir, tras un periodo de incubación largo, pero no superior a la esperanza de vida de esta especie, además, probablemente el número de priones C-EEB presentes en el inóculo original de scrapie atípico era demasiado bajo para producir la enfermedad en las vacas con solo un primer pase. También hay que considerar que los ratones TgBov sobreexpresan 8 veces la PrP^C bovina, haciéndolos más susceptibles a desarrollar la enfermedad tras la inoculación.

Los priones obtenidos tras la amplificación con la técnica de PMCA del encéfalo de los bovinos inoculados mostraron un patrón de glicosilación idéntico que los priones de la C-EEB y de los productos obtenidos mediante PMCA a partir de priones de C-EEB. Para resolver la duda de si los priones de la EEB clásica estaban presentes en el aislado original de scrapie atípico o si emergieron en el encéfalo de las vacas después de la inoculación, se realizó PMCA del inóculo original en sustrato TgBov y esta amplificación dio como resultado priones bioquímicamente indistinguibles de la C-EEB y de las reacciones positivas de PMCA sembradas con muestras de encéfalo de los bovinos inoculados, lo que sugiere que, como se describió anteriormente, ciertos aislados de scrapie atípico contienen niveles bajos de priones de C-EEB (Huor et al., 2019).

Como control negativo de esta técnica se incluyeron dos encéfalos de vacas de la misma edad no inoculadas, en los cuales no se observó amplificación de priones tras la propagación con sustrato TgBov, lo que descarta un plegamiento *in vitro* espontáneo de la PrP bovina durante la PMCA. Para complementar estos resultados se están llevando a cabo bioensayos en líneas de ratón que expresan PrP bovina y ovina, para confirmar así la infectividad de los productos de PMCA obtenidos en este estudio.

Al igual que en el estudio de los porcinos, el hecho de que los intervalos de tiempo entre la inoculación y la aparición de priones C-EEB en el encéfalo de los bovinos inoculados no estén correlacionados y la aparición también de estos priones tras la realización de PMCA en el inóculo original, respaldan la teoría de la presencia de niveles bajos de priones de C-EEB en los aislados de scrapie atípico. También parece indicar que estos priones no estén distribuidos de manera homogénea, y en consecuencia los animales durante la inoculación recibirían diferentes cantidades de confórmeros de la EEB. Además, el hecho de que la aparición de estos priones de

EEB en el encéfalo de los bovinos, al igual que en el caso de los porcinos, se encontraran en zonas anatómicas alejadas del punto de inoculación, respalda la teoría de que se ha producido una propagación genuina de priones similares a la C-EEB.

Estos hallazgos muestran la posibilidad de transmisión entre especies de enfermedades priónicas y la aparición de nuevas cepas de priones, lo que puede ser una cuestión preocupante con implicaciones en salud pública y seguridad alimentaria, por lo que se debería realizar una vigilancia y seguimiento continuos de estas enfermedades tanto en animales como en el ser humano. Asimismo, se recomienda el uso de técnicas de detección ultrasensibles como la PMCA para la detección temprana de las enfermedades priónicas.

9. CONCLUSIONES

1. Los signos clínicos en el scrapie atípico son bastante constantes en todos los animales afectados, independientemente de su genotipo, o de la edad de inoculación. Sin embargo, son significativamente diferentes a los signos del scrapie clásico. El diagnóstico clínico de los animales afectados por scrapie atípico se puede conseguir de forma mucho más prematura si se observa a los animales privándoles totalmente del sentido de la vista.

2. El periodo de incubación del scrapie atípico está condicionado por el genotipo del animal, siendo en los animales de genotipo ARR/AHQ más corto que en los AHQ/AHQ. La evolución clínica en los animales afectados de scrapie atípico de genotipo ARR/AHQ es muy prolongada en el tiempo, llegando a sobrevivir en buenas condiciones de manejo durante más de 3 años tras la aparición de las primeras manifestaciones clínicas.

3. El patrón de distribución de los depósitos de PrP^{Sc} en el encéfalo de los ovinos afectados por scrapie atípico es muy similar, independientemente del genotipo de los animales o la edad de inoculación, incluso en fase preclínica de la enfermedad. Las principales zonas anatómicas afectadas son cerebelo y tálamo, en consonancia con los principales signos clínicos observados y relacionados con déficits propioceptivos. La distribución no circunscrita al SNC es muy limitada, encontrándose únicamente depósitos de PrP^{Sc} en algunas zonas del SNP, como en retina o bulbos olfatorios.

4. El papel de la placenta en la transmisión del scrapie atípico tiene poca relevancia, ya que la distribución de la PrP^{Sc} en este tejido en animales afectados es nula o muy escasa para suponer un riesgo epidemiológico importante. No obstante, tras los resultados obtenidos mediante la técnica de diagnóstico ultrasensible PMCA, no hay que descartar que la placenta pudiese portar algún agente priónico en animales infectados experimentalmente.

5. La transmisión experimental del scrapie atípico en ovino por vía oral es menos eficiente que la transmisión por vía intracerebral. A pesar de no mostrar sintomatología, han sido detectados pequeñas cantidades de priones en el encéfalo de animales inoculados vía oral.

6. La especie porcina presenta una fuerte barrera de transmisión frente al scrapie atípico, incluso cuando es sometido a una infección experimental por vía intracerebral. No obstante, una cantidad limitada de priones ha sido detectada por técnicas de amplificación *in vitro* en el encéfalo de porcinos inoculados con agentes de scrapie atípico. Estos hallazgos refuerzan la idea de que es importante mantener las medidas implementadas para prohibir la inclusión de proteínas de rumiantes en la alimentación de otras especies ganaderas.

7. El ganado bovino presenta gran resistencia a la infección por scrapie atípico, y tras infección experimental por vía intracerebral, los priones responsables de esta enfermedad no son detectables por técnicas convencionales. Con técnicas de amplificación *in vitro*, pueden propagarse por el encéfalo y dar lugar a priones con características idénticas a las de la EEB bovina.

8. Los métodos de diagnóstico convencionales para las enfermedades priónicas como ELISA, IHQ o Western Blot, son muy útiles cuando hay presencia de abundante proteína priónica, sin embargo, son de baja eficacia ante infecciones menores, siendo necesario en este caso, utilizar métodos más sensibles como el bioensayo o, especialmente, la técnica de amplificación de priones PMCA.

10. RESUMEN/ABSTRACT

9.1. RESUMEN

Las enfermedades priónicas o EET son trastornos neurodegenerativos fatales que afectan al ser humano y a diferentes especies animales. El agente causal, llamado prion, es una proteína anormal (PrP^{Sc}) derivada de un cambio conformacional de una proteína celular normal (PrP^{C}). Estas enfermedades provocan una degeneración espongiforme en el SNC, con signos clínicos de tipo neurológico en los individuos afectados. Las EET pueden ser esporádicas, hereditarias o infecciosas.

El scrapie es la EET que afecta a los ovinos y se presenta de dos formas: clásica y atípica. No hay evidencias de la transmisión natural del scrapie atípico. Sin embargo, sí que es transmisible mediante infecciones experimentales y algunos estudios sugieren la posibilidad de que esta enfermedad pudiera ser el origen de la encefalopatía espongiforme bovina, lo que aumenta su relevancia biológica.

Debido a esta posibilidad, el objetivo principal de este trabajo de investigación recogido en esta tesis doctoral ha sido profundizar en el estudio de la transmisibilidad y la infectividad del scrapie atípico, y para ello se han realizado estudios de transmisión experimental en diferentes especies.

En dos de los estudios se realizaron infecciones experimentales en ovino, la especie hospedadora natural, mediante inoculación intracerebral, en el estudio número uno, y por vía oral en el estudio número tres. En el estudio número dos se analizaron las placentas de los animales procedentes del estudio uno, en el estudio cuatro se realizó una infección experimental vía intracerebral en la especie porcina y, por último, en el estudio número cinco, se realizó una infección experimental en la especie bovina, también por vía intracerebral.

En el estudio número uno, los ovinos inoculados por vía intracerebral con scrapie atípico, pertenecientes a dos genotipos diferentes, mostraron, casi todos, sintomatología clínica y ésta fue muy similar en todos ellos. Sí que se observaron diferencias en el periodo de incubación y, sobre todo, en el periodo de patencia, siendo este último mucho más elevado en animales ARR/AHQ. El patrón lesional y de depósito de PrP^{Sc} observado también fue muy homogéneo en todos los animales del estudio. Únicamente se detectó presencia de PrP^{Sc} en el sistema nervioso central, siendo especialmente intensa en la zona del cerebelo, y en algunos puntos del sistema nervioso periférico, concretamente en el bulbo olfatorio, nervio óptico y la retina.

Durante el experimento, los animales se reprodujeron y, tras el parto, las placentas fueron recogidas y analizadas, en el estudio número dos. El estudio de este tejido se realizó mediante técnicas convencionales y mediante bioensayo en modelo murino. No se detectó la presencia de la PrP^{Sc} mediante métodos convencionales, ni en las placentas, ni en los encéfalos de los ratones inoculados con dichos tejidos. Sin embargo, al analizar los encéfalos murinos mediante la técnica de diagnóstico ultrasensible PMCA, se observó amplificación de priones con un perfil de glicosilación bioquímicamente idéntico al del scrapie clásico.

Los ovinos infectados con scrapie atípico por vía oral en el estudio número tres, no mostraron sintomatología clínica, tras haber transcurrido más de 10 años tras la inoculación. En el estudio

de los tejidos de estos animales no se detectó presencia de PrP^{Sc} mediante las técnicas convencionales ELISA e inmunohistoquímica. Al realizar la técnica PMCA, sí que encontramos, en uno de los encéfalos de estos ovinos, amplificación de priones, que puede indicar la presencia de pequeñas cantidades de PrP^{Sc} en el encéfalo de alguno de estos animales.

En el estudio número cuatro, se evaluó la susceptibilidad de la especie porcina al scrapie atípico, tras una infección experimental de dos aislados de esta enfermedad, por vía intracerebral. Se confirma la fuerte barrera de transmisión que presenta esta especie frente a las enfermedades priónicas, ya que, ninguno de los 12 animales inoculados, presentó signos clínicos en ningún momento y todos resultaron negativos a la presencia de PrP^{Sc} mediante las técnicas de diagnóstico ELISA, IHQ, Western Blot y bioensayo en ratones TgPo. Sin embargo, tras la realización de la técnica PMCA, se observó la presencia de priones de EEB en diferentes áreas del encéfalo de siete cerdos inoculados con ambos aislados de scrapie atípico.

Por último, en el estudio número cinco, se estudió la trasmisión del scrapie atípico a la especie bovina. Para ello se inocularon por vía intracerebral 4 bovinos jóvenes con un aislado de scrapie atípico. Estos animales fueron sacrificados, varios años después de la inoculación, sin haber mostrado signos clínicos neurológicos y el estudio de sus tejidos mediante IHQ, ELISA y Western Blot proporcionó un resultado negativo para la acumulación de PrP^{Sc}. Sin embargo, se detectó una aparición de priones similares a la EEB durante la propagación *in vitro* de muestras de encéfalo de los animales inoculados.

Los hallazgos obtenidos en estos dos últimos estudios sugieren que, estas dos especies ganaderas si son expuestas a priones del scrapie atípico, podrían convertirse en reservorios de la EEB, lo que plantea una preocupación sobre la posible transmisión inter-especies, y sugiere que se debería, por tanto, realizar una vigilancia y seguimiento continuos de estas enfermedades tanto en animales como en el ser humano.

Aunque prácticamente todos los estudios plantean interrogantes y la posibilidad de continuar con nuevos experimentos que permitan corroborar y ampliar los resultados obtenidos, los objetivos iniciales se han cumplido, ya que se ha profundizado en el conocimiento sobre diferentes aspectos relacionados con la transmisibilidad y la infectividad del scrapie atípico.

9.2. ABSTRACT

Prion diseases (TSEs) are fatal neurodegenerative disorders affecting humans and different animal species. The causative agent, called prion, is an abnormal protein (PrP^{Sc}) derived from a conformational change of a normal cellular protein (PrP^{C}). These diseases cause spongiform degeneration in the CNS, with neurological clinical signs in affected individuals. TSEs can be sporadic, hereditary or infectious.

Scrapie is the TSE affecting sheep and goats and occurs in two forms: classical and atypical. There is no evidence of natural transmission of atypical scrapie. However, it is transmissible through experimental infections and some studies suggest that this disease could be the origin of bovine spongiform encephalopathy (BSE), which increases its biological relevance.

Due to this possibility, the main objective of the research work included in this doctoral thesis is to study in depth the transmissibility and infectivity of atypical scrapie and, for this purpose, experimental transmission studies have been carried out in different species.

In two of the studies, experimental infections were performed in sheep, the natural host species. Intracerebral inoculation was used in study one and oral inoculation in study three. In study two, placentas from animals from study one were analysed. In study four, an experimental infection was performed via intracerebral inoculation in swine and, finally, in study five, an experimental infection was performed in cattle, also via intracerebral inoculation.

In study number one, sheep of two different *PRNP* genotypes were intracerebrally inoculated with atypical scrapie. Almost all animals showed clinical signs, which were very similar among individuals. Differences were observed in the incubation period but especially, in the length of the pathogenic period, which was much longer in ARR/AHQ animals. The pattern of spongiform lesions and PrP^{Sc} deposition was also very homogeneous in all the animals in the study. The presence of PrP^{Sc} was only detected in the central nervous system, being particularly intense in the cerebellum, and in some parts of the peripheral nervous system, specifically in the olfactory bulb, optic nerve and retina.

Sheep orally infected with atypical scrapie from study number three showed no clinical signs after more than 10 years post inoculation. The presence of PrP^{Sc} was not detected by conventional ELISA or immunohistochemistry (IHC) in tissues from these animals. However, we did find prion amplification in brain tissues from one of these sheep using the PMCA technique. Surprisingly, the glycosylation profile was similar to that of BSE.

In study number four, the susceptibility of the porcine species to atypical scrapie was evaluated after an experimental infection of two isolates of this disease via the intracerebral route. The strong transmission barrier of this species to prion diseases was confirmed since none of the 12 inoculated animals showed clinical signs and all were negative for the presence of PrP^{Sc} by ELISA, IHQ, Western Blot or bioassay in TgPo mice. However, after PMCA, BSE prions were detected in different areas of the brain of seven pigs inoculated with either of the atypical scrapie isolates.

Finally, in study number five, the transmission of atypical scrapie to cattle was studied. For this purpose, four calves were intracerebrally inoculated with an atypical scrapie isolate. These animals were slaughtered, several years after inoculation, without showing neurological clinical

signs. Tissue examination by IHC, ELISA and Western Blot revealed negative results for PrP^{Sc} accumulation. However, BSE-like prions were detected during the *in vitro* propagation of brain samples from the inoculated animals by PMCA

The findings obtained in the latter two studies suggest that these two livestock species, pigs and cattle, if exposed to atypical scrapie prions, could become BSE reservoirs, raising concerns about possible inter-species transmission, and suggesting that continued surveillance and monitoring of these diseases in both animals and humans should therefore be carried out.

Although all the studies included in this thesis raise questions and the possibility of performing new experiments to corroborate and complete the obtained results, the initial objectives have been fulfilled. We have contributed to the knowledge on different aspects related to the transmissibility and infectivity of atypical scrapie.

ANEXOS

<u>Anexo 1</u>: Protocolo de procesado de tejidos y elaboración de cortes histológicos.

- **Fijación y tallado:**
  1. Introducir la muestra en formol tamponado al 10% en volumen suficiente para que ésta flote libremente en el líquido fijador durante 24 horas.
  2. Tallar en una cabina de bioseguridad secciones de aproximadamente 2-3mm de grosor.
  3. Introducir las secciones en cassettes y dejarlos fijar en formol tamponado al 10% durante 24 horas.

- **Procesado del tejido:**
  Deshidratar e incluir el tejido en parafina. A continuación, se muestra el protocolo de rutina en el inclusor automático al vacío TP1050:

Reactivo	**Tiempo**	**Ambiente**
Formol 10%	10 min	Ambiente
Alcohol 70º	2 h	Ambiente
Alcohol 70º	2 h	Ambiente
Alcohol 96º	1 h	Ambiente
Alcohol 96º	1 h	Ambiente
Alcohol 100º	1 h	Ambiente
Alcohol 100º	2 h	Ambiente
Alcohol 100º	2 h	Ambiente
Xileno	1 ½ h	Ambiente
Xileno	1 ½ h	Ambiente
Parafina	1 ½ h	56-60ºC
Parafina	1 ½ h	56-60ºC
Parafina	1 ½ h	56-60ºC

- **Montaje de bloques en la consola de parafina:**
  1. Dejar los bloques en parafina líquida durante un mínimo de 30'.
  2. Abrir los cassettes y colocar el tejido en un molde lleno de parafina líquida.
  3. Dejar solidificar la parafina a temperatura ambiente sobre una placa fría, formándose así un bloque sólido con el tejido en su interior.
  4. Desbastar el bloque de parafina mediante cortes de 15µm hasta que todo el tejido esté representado en la superficie de corte.
  5. Enfriar los bloques durante aproximadamente 2 horas (4ºC) para facilitar el corte posterior.
  6. Realizar corte de 4 µm.
  7. Depositar las secciones en un baño termostático a aproximadamente 45ºC, de modo que los cortes floten y se estiren, evitando la presencia de arrugas en los mismos.
  8. Recoger las secciones con portaobjetos tratados con xilol (starfrost).
  9. Secar los portaobjetos a 56ºc durante 30' o a 37ºC durante 12 horas.

<u>Anexo 2</u>. Técnica inmunohistoquímica para la detección de PrP^{Sc} en todos los tejidos.

Cortar las secciones (3-5 µm) y recogerlas sobre portaobjetos tratados (starfrost).
Secar las secciones toda la noche a 56º C.

- **Desparafinado:**
  1. Xilol: 5m.
  2. Xilol:5m.
  3. Alcohol 100º: 5m.
  4. Alcohol 100º: 5m.
  5. Alcohol 96º: 3m.
  6. Alcohol 70º: 3m.

- **Desenmascarado de epítopos:**
  1. Inmersión de las secciones en ácido fórmico (98%):10m.
  2. Lavar 10m en agua corriente.
  3. Digestión con proteinasa K: 4g/ml, 15m a 37ºC ml de tampón precalentado.
  4. Autoclavado hidratado con tampón citrato: 10m a 96ºC.

- **Inmunodetección:**
  1. Cubrir las muestras con solución de peroxidasa (kit Envision-DAB. DAKO) durante 5m para bloquear la peroxidasa endógena.
  2. Incubar las muestras con el anticuerpo primario anti-PrP durante 1 h (3F4 1:1000) o toda la noche en refrigeración (R486 1:8000).
  3. Lavar con Wash buffer (Tween 20 al 0.1 % en H2Od) 5m x 3 veces.
  4. Incubar con el polímero marcado Envision "goat anti-mouse" (kit Envision DAB, DAKO) durante 30m.
  5. Lavar con Wash buffer 5m x 3 veces.
  6. Incubar con el cromógeno DAB plus (kit Envision DAB, DAKO) 5m.
  7. Lavar con H2Od 5m x 3 veces.
  8. Teñir las muestras con hematoxilina durante 5m.
  9. Lavar con agua destilada.

- **Deshidratación y montaje:**
  1. Alcohol 70º: inmersión (x 3), Alcohol 96º: inmersión (x 3), Alcohol 100º: inmersión (x.3), Alcohol 100º: inmersión (x 3), Xilol: inmersión (x 3), Xilol: inmersión 5m.
  2. Montar en DPX.

Anexo 3. Técnica de ELISA IDEXX HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test Kit, EIA

- **Trituración de la muestra:**

1. Tallar una masa de entre 0,30g – 0,35 g de tejido.
2. Triturar las muestras en el interior de los tubos de trituración con el homogeneizador Precess 48. En este procedimiento se utiliza el modo segundo (mode 2). Este modo ejecuta dos fases de agitación iguales de 45 segundos a 6500 rpm con un tiempo de espera de 60 segundos por ciclo. Se realizan 3-4 ciclos para todas las muestras a excepción del tejido nervioso que es suficiente con un ciclo, dejando enfriar los homogenizados entre ciclos.

- **Bloqueo la PrP^{C}:**

1. Preparar el diluyente de la placa de trabajo (mezcla del D1 y D2 en la proporción 40 µl de D2 en 1 ml de D1, el D2 está liofilizado y se reconstituye con 200µl de tampón R).
2. Añadir 30 µl de diluyente a cada pocillo sin hacer burbujas.
3. Transferir 120 µl del contenido de los tubos al pocillo correspondiente de la placa de dilución.
4. Reconstituir los controles que vienen liofilizados con 1 ml de Tampón R.

- **Detección de la PrP^{res}:**

1. Distribuir 100 µl de muestra diluida (dejando libre la posición para los controles), a la placa de captura de antígeno con una pipeta multicanal, previa homogeneización.
2. Distribuir 100 µl de cada uno de los controles. El control positivo (CTP) y el control negativo (CTN) se colocan por duplicado.
3. Cubrir e incubar la placa de captura en agitación lenta (200rpm) y a temperatura ambiente durante 60 minutos.
4. Lavar la placa antigenada mediante seis ciclos seguidos de llenado y vaciado de los pocillos con solución de lavado 1. (W1 diluida 1/10, Columbus Pro Strip Washer de Tecan con el programa IDEXX TSE 1).
5. Secar por inversión y con ligeros golpes en papel absorbente antes del siguiente paso.
6. Añadir 100 µl del tampón de acondicionamiento.
7. Incubar con la placa tapada: 10 ± 1 minutos a temperatura ambiente.
8. Lavar la placa antigenada a temperatura ambiente mediante tres ciclos seguidos de llenado y vaciado de los pocillos con solución de lavado 2 (W2 diluido al 1/10, Columbus Pro Strip Washer de Tecan con el programa IDEXX TSE 2).
9. Secar por inversión y con ligeros golpes en papel absorbente antes del siguiente paso.
10. Añadir 100 µl del conjugado que es la solución de anticuerpos anti-PrP conjugados de peroxidasa de rábano picante (HRPO). Diluir el concentrado de conjugado (CC) en el diluyente de conjugado (CD), el factor de dilución del conjugado CC viene indicado en los viales.
11. Sellar la placa con film adhesivo transparente.
12. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 45-50 minutos en reposo.
13. Lavar la placa de captura cinco veces con solución de lavado 2 (Columbus Pro Strip Washer de Tecan con el programa IDEXX TSE 3).

14. Añadir 100 µl de la solución del sustrato TMB y mantenerla protegida de la luz cubriendo la placa con un film adhesivo de papel de plata. Incubar en oscuridad: 15 minutos a temperatura ambiente.
15. Añadir 10 µl de la solución de parada (ácido clorhídrico 1M) a cada pocillo.
16. No deben transcurrir más de 30 minutos desde la adición de la solución de parada y la lectura de la placa.
17. Lectura de resultados. En un tiempo máximo de 30 minutos se procede a la lectura de la densidad óptica en un fotómetro bicromático a 450 nm con una longitud de onda de 650 nm, con el software Magellan utilizando el programa IDEXX Scrapie.

Anexo 4. Preparación de inóculos para bioensayo en ratón.

1. Homogenización de tejidos en suero salino fisiológico al 10% (0,1 g por cada ml de suero), empleando tubos de 1,5 ml con microcuentas de cerámicas y el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).
2. Filtración del homogenizado a través de una gasa estéril empleando una jeringuilla.
3. Añadir 1 µl del antibiótico ESPES Inyect (CASIER) por cada 2 ml de inóculo. Agitar para mezclar bien.
4. Realización de cultivo de los inóculos en placas de agar sangre para asegurar su esterilidad. Incubar a 37ºC durante una noche.
5. Alicuotar los inóculos y almacenarlos en congelación a -80ºC.

Anexo 5. Protocolo de PET-blot (paraffin-embedded tissue blot).

1. Realizar cortes de 4 µm de grosor con el microtomo y recuperarlos en membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm de tamaño de poro.
2. Secar durante al menos 24 horas en la estufa a 56ºC.
3. Desparafinado y rehidratado de las membranas:
    - 2 x 5 m en Tolueno.
    - 2 x 5 m en isopropanol (2-Propanol).
    - 2 x 5 m en Alcohol 96º.
    - 2 x 5 m en Alcohol 80º (preparar a partir de Alcohol 99º o 96º).
    - 1 x 5 m en agua corriente.
    - 1 x 5 m en Wash buffer.
    - 1 x 10 m en TBST.
4. Digestión: incubar membranas con 250 µg/ml de proteinasa K diluida en TBS + Brij 35P al 0,1% durante 2h al baño María (55-56ºC).
5. Lavar con TBST.
6. Desnaturalización de proteínas: incubar membranas con tiocianato de guanidino 3M en TBS durante 10 m.
7. Lavar con TBST + 1% leche (3 veces)
8. Saturación de membranas: incubar membranas con TBST + BSA al 0,2% durante 30 m.
9. Incubar membranas con el anticuerpo primario Sha31 (1:8000 en tampón de saturación) durante 1 h.
10. Lavar con TBST + 1% leche (3 veces).

11. Incubar con el anticuerpo secundario Polyclonal Goat anti-Mouse Inmunoglobulin/AP (1:500 en tampón de saturación) durante 1 h.
12. Lavar con TBST + 1% leche (3 veces).
13. Revelado: incubar las membranas con NBT/BCIP (nitroblue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) durante 45 m.
14. Parar la reacción con agua corriente y dejar secar las membranas a Tª ambiente.

<u>Anexo 6</u>. Protocolo de Western Blot para la detección de PrP^{res} en encéfalo.

Preparar un homogeneizado de encéfalo al 10% (peso/volumen) en PBS. Para ello se triturará la muestra utilizando tubos de 1,5 ml con microcuencas de cerámica(Bio-Rad) empleando el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).

- **Digestión:**
    1. Mezclar 100 ul del homogeneizado al 10% y mezclar con 100 ul de oveja negativa (preparada al 10%) para obtener un volumen final de 200 ul.
    2. Preparar Buffer de digestión: 1 ml de sarkosi al 10%l-SDS al 20% + 4 ul de PK.
    3. Añadir un volumen (200 ul) de PK y digerir durante 15min a 37ºC.
    4. Añadir 200 ul del reactivo 2-Butanol.
    5. Mezclar las muestras por inversión varias veces.
    6. Centrifugar los tubos durante 7 minutos a 15000g a 20ºC.
    7. Desechar el sobrenadante dándoles la vuelta sobre papel absorbente durante 5 minutos.
    8. Añadir 50 ul de buffer de carga 1X (con SDS y DTT).
    9. Dejar que las muestras se rehidraten a temperatura ambiente durante 5 minutos.
    10. Resuspender con una pipeta o vórtex.
    11. Incubar 5 minutos a 100ºC en bloque térmico.
    12. Centrifugar 15 minutos a 5000g a 20ºC.

- **Electroforesis:**
    1. Preparar tampón de migración (50 ml tampón MES + 950 ml H2O destilada.)
    2. Cargar 20-25 µl en los pocillos del gel (Criterion XT 12% Bis-Tris Precast Gel).
    3. Realizar la electroforesis a 80 V/30m + 150 V/90m.

- **Transferencia:**
    1. Preparar tampón de transferencia (1875 ml H2Od + 250 ml Tris CAPS 10 X + 375 ml etanol puro).
    2. Activar la membrana (Inmuno-Blot PVDF Membrane) con:
        a. Etanol puro: 15s.
        b. H2Od 5´ (en agitación lenta).
        c. Tampón de transferencia: 5m.
    3. Sacar el gel con cuidado manejándolo con una espátula húmeda.
    4. Realizar la transferencia a 150V durante 90m.

- **Fijación de proteínas:**
    1. Poner la membrana en agitación suave en los siguientes reactivos.

a. PBS 1x: 5-10s.
b. Etanol puro: 5-10s.
c. H2Od: 5m.

- **Inmunodetección:**
    1. Bloquear la membrana en una solución de leche desnatada al 5% durante 60m.
    2. Lavar con PBST 3 x 5m.
    3. Incubar la membrana con el anticuerpo primario anti-PrP durante 1 h (Sha31, 1:8000; 12B2 1:10000) diluido en PBSTm
    4. Lavar con PBST 3 x 5m.
    5. Incubar con anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina (1:5000) diluido en PBST durante 1hm
    6. Lavar con PBST 1 x 10m y 3 x 5m.

- **Revelado:**
    1. Incubar la membrana con el revelador ECL Select en oscuridad durante 5 minutos a oscuras.
    2. Hacer foto con el analizador de imagen.

<u>Anexo 7</u>: Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina.

Cortar las secciones (3-5 µm) y recogerlas sobre portaobjetos tratados (starfrost).
Secar las secciones toda la noche a 56º C.

- **Desparafinado:**

Se realizan una serie de inmersiones en los siguientes reactivos:

1. Xilol: 4m.
2. Xilol: 4m.
3. Alcohol 100º: 4m.
4. Alcohol 100º: 4m.
5. Alcohol 96º: 1m.
6. Alcohol 70º: 1m.
7. Agua corriente: 1m.

- **Tinción:**

Se realizan una serie de inmersiones en los siguientes reactivos:

1. Hematoxilina: 5m.
2. Agua corriente: 1m.
3. Alcohol ácido: 2m.
4. Eosina: 2m.

- **Deshidratación y montaje:**

1. Alcohol 100º: 1m.
2. Alcohol 100º: 1m.

3. Xilol: 1m.
4. Xilol: 5m.
5. Montar en Dibutylphtalate Poliestireno Xileno (DPX).

<u>Anexo 8</u>. Protocolo para la técnica de *Protein Mysfolding Cyclic Amplification* (PMCA).

- **Preparación los sustratos (homogenizados de material sano):**

1. Pesar 1.5-1.9 g de cerebros sanos perfundidos y añadirlos junto con 10 volúmenes de tampón PMCA en un "potter" (homogenizador), para conseguir un homogenizado al 10%. Homogenizar cuidadosamente
2. Verter el homogenizado en un Falcon de 50 ml
3. Dejar los homogenizados reposando 1h en hielo para permitir que las membranas sean digeridas por el tritón del tampón PMCA
4. Conservar a -80°C.

- **Preparar las semillas (homogenizados de material infeccioso):**

1. Pesar 1.5-1.9 g de cerebros y añadirlos junto con la cantidad correspondiente de PBS en un tubo de homogenización con microcuentas de 1.5 ml de PBS para conseguir un homogenizado al 10%
2. Someter a los tubos a 2-3 ciclos de homogenización en modo 2
3. Alicuotar 100 µl del sobrenadante en eppendorfs de 1.5 ml
4. Conservar a -20°C en posición vertical

- **Dilución seriada 1:10 de las semillas:**

1. Preparar un strip con 8 microtubos para cada serie de diluciones, y colocar 90 µl de tampón PMCA en cada uno
2. Coger 10 µl de la semilla y añadirlo al primer microtubo (dilución 10^{-1})
3. Coger 10 µl de la nueva dilución y añadirla al siguiente microtubo (dilución 10^{2}). Continuar diluyendo seriadamente hasta dilución 10^{-8}

- **Preparación de la placa de PMCA:**

1. Colocar un trozo de papel de aluminio sobre la poyata y una placa de 96 pocillos estéril para PMCA.
2. Descongelar el sustrato al baño María 37°C
3. Colocar una cuenta de teflón de 0.22 µm de diámetro en el fondo de cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Manejarlas con pinzas estériles.
4. Homogenizar el sustrato descongelado con una pipeta de 1000 µl
5. Verter el sustrato en una bañera y con una pipeta multicanal de 200 µl, colocar 45 µl de sustrato en cada pocillo. Usar pipeteo inverso (si se usa sustrato con dextrano al 0.5%, mezclar 40 µl de sustrato con 5 µl de una solución de dextrano al 5%).

6. Con una pipeta multicanal de 10 µl, coger 5 µl de cada microtubo de los strips preparados con la dilución de las semillas depositarlos en el pocillo correspondiente de la placa de PMCA. Mezclar bien mediante pipeteo.
7. Cerrar los pocillos con las tiras de tapas estériles.
8. Aislar la placa con parafilm.

- **PMCA:**
  1. Asegurar que el circuito de agua está activado: baño maría y bomba peristáltica encendidos, Tª de la cámara de sonicador de mínimo 37°C y flujo constante.
  2. Colocar la placa en la gradilla del sonicador y colocar encima otra gradilla.
  3. Verificar que el nivel del agua de la corona del sonicador llega al nivel de la muestra en los pocillos de la placa.
  4. Colocar la tapa del sonicador y cerrar la cámara anecoica.
  5. Establecer los parámetros de sonicación. Para 24 horas: amplitud 75; tiempo total de sonicación: 16 min; tiempo de cada sonicación: 10 seg; tiempo entre cada sonicación: 14 min 50 seg.

- **Siguiente ciclo de PMCA:**
  1. Preparar la nueva placa de PMCA con sustrato de la misma manera.
  2. Sacar la placa de PMCA del sonicador y centrifugarla para recuperar todo el volumen en el fondo de los pocillos.
  3. Retirar el parafilm y las filas de tapas evitando la propulsión de gotas y la contaminación de los pocillos.
  4. Coger 5 µl de cada pocillo y añadirlos a la nueva placa de PMCA y colocar en el sonicador.
  5. Cerrar la placa vieja con un papel film adhesivo con la referencia de la placa y guardar a -20°C.

<u>Anexo 9</u>: Protocolo de Dot Blot para la detección de PrP^{Sc}.

- **Digestión:**
  1. Añadir 2 µl de SDS al 3% a 18 µl del homogeneizado.
  2. Diluir la PK (18,6 mg/ml) en DPBS 1x y añadir 5 µl a la muestra.
  3. Incubar a 37ºC durante 1 h.
  4. Añadir 25 µl de Laemmli Sample Buffer 2x (Bio-rad) para detener la digestión.
  5. Desnaturalizar a 95ºC durante 5 m.

- **Transferencia:**
  1. Añadir 25 µl de SDS al 1% a 5 µl de la muestra desnaturalizada.
  2. Inmersión del papel Whatman y de la membrana de nitrocelulosa (0,2 µm) en buffer de transferencia.
  3. Depositar suavemente 30 µl de muestra sobre la membrana.
  4. Esperar 20-30 s.
  5. Limpiar los pocillos añadiendo 100 µl de SDS al 1% (2 veces) y esperar 1 m.

6. Limpiar la membrana con PBST (10 s x 2).

- **Inmunodetección:**

  1. Bloqueo de la membrana en 50 ml de PBST 0,1% + BSA 2% durante 30 s en agitación lenta.
  2. Incubación con 30 ml del anticuerpo primario Sha31, diluido 1:8000 en PBST + BSA.
  3. Mantener en agitación lenta durante 30 m.
  4. Lavado con PBST 1 x 5 m y 1 x 10 m en agitación rápida.
  5. Incubación con 40 ml del anticuerpo secundario HRP anti-mouse (Bio-rad), diluido.
  6. Diluir 1:5000 en PBST + BSA y mantener durante 20 m en agitación lenta.
  7. Lavado con PBST 1 x 5 m y 1 x 10 m en agitación rápida.
  8. Sumergir la membrana en H_2Od para eliminar los restos de PBST.

- **Revelar la membrana con 750 µl de luminol y 750 µl de peróxido (Pierce) y visualizarla con Versa Doc System (Bio-rad).**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acín, C., Bolea, R., Monzón, M., Monleón, E., Moreno, B., Filali, H., . . . Badiola, J. J. (2021). Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. Review on the Etiology, Genetic Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Control Measures of Both Diseases. *Animals (Basel)*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/ani11030691

Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., . . . Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *85*(Pt 7), 2103-2110. https://doi.org/10.1099/vir.0.80047-0

Acín, C., Martín-Burriel, I., Monleón, E., Lyahyai, J., Pitarch, J. L., Serrano, C., . . . Badiola, J. J. (2013). Prion protein gene variability in Spanish goats. Inference through susceptibility to classical scrapie strains and pathogenic distribution of peripheral PrP(sc.). *PLoS One*, *8*(4), e61118. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061118

Acutis, P. L., Martucci, F., D'Angelo, A., Peletto, S., Colussi, S., Maurella, C., . . . Lombardi, G. (2012). Resistance to classical scrapie in experimentally challenged goats carrying mutation K222 of the prion protein gene. *Vet Res*, *43*(1), 8. https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-8

Acutis, P. L., Martucci, F., Mazza, M., Peletto, S., Iulini, B., Corona, C., . . . Caramelli, M. (2006). A case of scrapie in a sheep carrying the lysine-171 allele of the prion protein gene. *Arch Virol*, *151*(9), 1875-1880. https://doi.org/10.1007/s00705-006-0748-5

Acutis, P. L., Sbaiz, L., Verburg, F., Riina, M. V., Ru, G., Moda, G., . . . Bossers, A. (2004). Low frequency of the scrapie resistance-associated allele and presence of lysine-171 allele of the prion protein gene in Italian Biellese ovine breed. *J Gen Virol*, *85*(Pt 10), 3165-3172. https://doi.org/10.1099/vir.0.80053-0

Agrimi, U., Ru, G., Cardone, F., Pocchiari, M., & Caramelli, M. (1999). Epidemic of transmissible spongiform encephalopathy in sheep and goats in Italy. *Lancet*, *353*(9152), 560-561. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)04545-0

Aguzzi, A. (2001). Peripheral prion pursuit. *J Clin Invest*, *108*(5), 661-662. https://doi.org/10.1172/jci13919

Aguzzi, A., & Heikenwalder, M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook [Research Support, Non-U.S. Gov't Review]. *Nat Rev Microbiol*, *4*(10), 765-775. https://doi.org/10.1038/nrmicro1492

Aiken, J. M., Williamson, J. L., & Marsh, R. F. (1989). Evidence of mitochondrial involvement in scrapie infection. *J Virol*, *63*(4), 1686-1694. https://doi.org/10.1128/jvi.63.4.1686-1694.1989

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, *214*(5090), 764-766. https://doi.org/10.1038/214764a0

Alvarez, L., Arranz, J. J., & San Primitivo, F. (2006). Identification of a new leucine haplotype (ALQ) at codon 154 in the ovine prion protein gene in Spanish sheep [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Anim Sci*, *84*(2), 259-265. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16424251

Alverson, J., O'Rourke, K. I., & Baszler, T. V. (2006). PrPSc accumulation in fetal cotyledons of scrapie-resistant lambs is influenced by fetus location in the uterus. *J Gen Virol*, *87*(Pt 4), 1035-1041. https://doi.org/10.1099/vir.0.81418-0

Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., . . . Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *81*(Pt 12), 3115-3126. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3115

Andréoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., . . . Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie:

influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol*, *83*(Pt 10), 2607-2616. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2607

Andréoletti, O., Morel, N., Lacroux, C., Rouillon, V., Barc, C., Tabouret, G., . . . Lantier, F. (2006). Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *J Gen Virol*, *87*(Pt 4), 1043-1046. https://doi.org/10.1099/vir.0.81318-0

Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaise, C., Simon, S., . . . Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, *7*(2), e1001285. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001285

Andréoletti, O., Simon, S., Lacroux, C., Morel, N., Tabouret, G., Chabert, A., . . . Schelcher, F. (2004). PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med*, *10*(6), 591-593. https://doi.org/10.1038/nm1055

Ano, Y., Nakayama, H., Sakai, Y., Sakudo, A., Endo, M., Ebisu, S., . . . Onodera, T. (2008). Incorporation of beta-amyloid protein through the bovine ileal epithelium before and after weaning: model for orally transmitted amyloidoses. *Microbiol Immunol*, *52*(8), 429-434. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00054.x

Arsac, J. N., Andreoletti, O., Bilheude, J. M., Lacroux, C., Benestad, S. L., & Baron, T. (2007). Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg Infect Dis*, *13*(1), 58-65. https://doi.org/10.3201/eid1301.060393

Arsac, J. N., Bétemps, D., Morignat, E., Féraudet, C., Bencsik, A., Aubert, D., . . . Baron, T. (2009). Transmissibility of atypical scrapie in ovine transgenic mice: major effects of host prion protein expression and donor prion genotype. *PLoS One*, *4*(10), e7300. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007300

Baldauf, E., Beekes, M., & Diringer, H. (1997). Evidence for an alternative direct route of access for the scrapie agent to the brain bypassing the spinal cord. *J Gen Virol*, *78 (Pt 5)*, 1187-1197. https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-5-1187

Barrio, T., Filali, H., Otero, A., Sheleby-Elias, J., Marin, B., Vidal, E., . . . Bolea, R. (2020). Mixtures of prion substrains in natural scrapie cases revealed by ovinised murine models. *Sci Rep*, *10*(1), 5042. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61977-1

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D. F., . . . Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, *46*(3), 417-428. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90662-8

Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E., Goldmann, W., Smith, A., Sivam, K., . . . Gravenor, M. B. (2004). Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *J Gen Virol*, *85*(Pt 9), 2735-2740. https://doi.org/10.1099/vir.0.79876-0

Baylis, M., & McIntyre, K. M. (2004). Transmissible spongiform encephalopathies: scrapie control under new strain. *Nature*, *432*(7019), 810-811. https://doi.org/10.1038/432810a

Beck, K. E., Thorne, L., Lockey, R., Vickery, C. M., Terry, L. A., Bujdoso, R., & Spiropoulos, J. (2013). Strain typing of classical scrapie by transgenic mouse bioassay using protein misfolding cyclic amplification to replace primary passage. *PLoS One*, *8*(3), e57851. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057851

Beekes, M., & McBride, P. A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neurosci Lett*, *278*(3), 181-184. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653023

Beekes, M., & McBride, P. A. (2007). The spread of prions through the body in naturally acquired transmissible spongiform encephalopathies. *Febs j*, *274*(3), 588-605. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05631.x

Beekes, M., McBride, P. A., & Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, *79 (Pt 3)*, 601-607. https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-3-601

Begara-McGorum, I., Clark, A. M., Martin, S., & Jeffrey, M. (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec*, *147*(16), 439-441. https://doi.org/10.1136/vr.147.16.439

Bellworthy, S. J., Hawkins, S. A., Green, R. B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., . . . Simmons, M. M. (2005). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec*, *156*(7), 197-202. https://doi.org/10.1136/vr.156.7.197

Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *Journal of General Virology*, *76 (Pt 3)*, 509-517. https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-3-509

Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W., & Noremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, *39*(4), 19. https://doi.org/10.1051/vetres:2007056

Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M. A., & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*, *153*(7), 202-208. https://doi.org/10.1136/vr.153.7.202

Billinis, C., Psychas, V., Leontides, L., Spyrou, V., Argyroudis, S., Vlemmas, I., . . . Papadopoulos, O. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Gen Virol*, *85*(Pt 2), 547-554. https://doi.org/10.1099/vir.0.19520-0

Bolea, R., Monleón, E., Schiller, I., Raeber, A. J., Acín, C., Monzón, M., . . . Badiola, J. J. (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*(5), 467-469. https://doi.org/10.1177/104063870501700511

Bolton, D. C., McKinley, M. P., & Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, *218*(4579), 1309-1311. https://doi.org/10.1126/science.6815801

Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., & Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*, *110*(3), 743-752. https://doi.org/10.1083/jcb.110.3.743

Bosque, P. J., Ryou, C., Telling, G., Peretz, D., Legname, G., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2002). Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(6), 3812-3817. https://doi.org/10.1073/pnas.052707499

Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B., & Smits, M. A. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *Journal of General Virology*, *77 (Pt 10)*, 2669-2673. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2669

Brandel, J. P., Culeux, A., Grznarova, K., Levavasseur, E., Lamy, P., Privat, N., . . . Haik, S. (2019). Amplification techniques and diagnosis of prion diseases. *Rev Neurol (Paris)*, *175*(7-8), 458-463. https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.06.002

Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., . . . Aguzzi, A. (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Nature*, *379*(6563), 339-343. https://doi.org/10.1038/379339a0

Brandsma, J. H., Janss, L. L. G., & Visscher, A. H. (2005). Association between PrP genotypes and performance traits in an experimental Dutch Texel herd. *Livestock Production Science*, *95*(1-2), 89-94. https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2004.12.011

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. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *343*(1306), 405-411. https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0036

Bruce, M. E., Boyle, A., Cousens, S., McConnell, I., Foster, J., Goldmann, W., & Fraser, H. (2002). Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Gen Virol*, *83*(Pt 3), 695-704. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11842264

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., . . . Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, *389*(6650), 498-501. https://doi.org/10.1038/39057

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Cell*, *73*(7), 1339-1347. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8100741

Burger, D., & Hartsough, G. R. (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J Infect Dis*, *115*(4), 393-399. https://doi.org/10.1093/infdis/115.4.393

Buschmann, A., Biacabe, A. G., Ziegler, U., Bencsik, A., Madec, J. Y., Erhardt, G., . . . Groschup, M. H. (2004). Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*, *117*(1), 27-36. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.11.017

Buschmann, A., & Groschup, M. H. (2005). TSE eradication in small ruminants--quo vadis? *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, *118*(9-10), 365-371.

Buschmann, A., Lühken, G., Schultz, J., Erhardt, G., & Groschup, M. H. (2004). Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol*, *85*(Pt 9), 2727-2733. https://doi.org/10.1099/vir.0.79997-0

Caplazi, P., O'Rourke, K., Wolf, C., Shaw, D., & Baszler, T. V. (2004). Biology of PrPsc accumulation in two natural scrapie-infected sheep flocks. *J Vet Diagn Invest*, *16*(6), 489-496. https://doi.org/10.1177/104063870401600601

Caramelli, M., Ru, G., Casalone, C., Bozzetta, E., Acutis, P. L., Calella, A., & Forloni, G. (2001). Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against Mycoplasma agalactiae. *Vet Rec*, *148*(17), 531-536. https://doi.org/10.1136/vr.148.17.531

Carlson, G. A., Kingsbury, D. T., Goodman, P. A., Coleman, S., Marshall, S. T., DeArmond, S., . . . Prusiner, S. B. (1986). Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, *46*(4), 503-511. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90875-5

Casalone, C., Corona, C., Crescio, M. I., Martucci, F., Mazza, M., Ru, G., . . . Caramelli, M. (2005). Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. *J Virol*, *79*(9), 5847-5849. https://doi.org/10.1128/jvi.79.9.5847-5849.2005

Cassmann, E. D., & Greenlee, J. J. (2020). Pathogenesis, detection, and control of scrapie in sheep. *Am J Vet Res*, *81*(7), 600-614. https://doi.org/10.2460/ajvr.81.7.600

Cassmann, E. D., Mammadova, N., Moore, S. J., Benestad, S., & Greenlee, J. J. (2021). Transmission of the atypical/Nor98 scrapie agent to Suffolk sheep with VRQ/ARQ, ARQ/ARQ, and ARQ/ARR genotypes. *PLoS One*, *16*(2), e0246503. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246503

Castilla, J., Gutiérrez-Adán, A., Brun, A., Doyle, D., Pintado, B., Ramírez, M. A., . . . Torres, J. M. (2004). Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. *J Neurosci*, *24*(21), 5063-5069. https://doi.org/10.1523/jneurosci.5400-03.2004

Castilla, J., Gutiérrez Adán, A., Brun, A., Pintado, B., Ramírez, M. A., Parra, B., . . . Torres, J. M. (2003). Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch Virol*, *148*(4), 677-691. https://doi.org/10.1007/s00705-002-0958-4

Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, *121*(2), 195-206. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.011

Castilla, J., Saá, P., Morales, R., Abid, K., Maundrell, K., & Soto, C. (2006). Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol*, *412*, 3-21. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(06)12001-7

Caughey, B., & Chesebro, B. (2001). Transmissible spongiform encephalopathies and prion protein interconversions. *Adv Virus Res*, *56*, 277-311. https://doi.org/10.1016/s0065-3527(01)56031-5

Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., & Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, *63*(1), 175-181. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2562814

Caughey, B., & Raymond, G. J. (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*(27), 18217-18223.

Caughey, B., Raymond, G. J., Priola, S. A., Kocisko, D. A., Race, R. E., Bessen, R. A., . . . Chesebro, B. (1999). Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update. *Mol Biotechnol*, *13*(1), 45-55. https://doi.org/10.1385/mb:13:1:45

Chen, B., Morales, R., Barria, M. A., & Soto, C. (2010). Estimating prion concentration in fluids and tissues by quantitative PMCA. *Nat Methods*, *7*(7), 519-520. https://doi.org/10.1038/nmeth.1465

Chen, R. L., Kassem, N. A., Redzic, Z. B., Chen, C. P., Segal, M. B., & Preston, J. E. (2009). Age-related changes in choroid plexus and blood-cerebrospinal fluid barrier function in the sheep. *Exp Gerontol*, *44*(4), 289-296. https://doi.org/10.1016/j.exger.2008.12.004

Chen, S. G., & Gambetti, P. (2002). A journey through the species barrier. *Neuron*, *34*(6), 854-856. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00736-5

Chesebro, B. (1999). Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathy diseases. *Neuron*, *24*(3), 503-506. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)81105-8

Clouscard, C., Beaudry, P., Elsen, J. M., Milan, D., Dussaucy, M., Bounneau, C., . . . Laplanche, J. L. (1995). Different allelic effects of the codons 136 and 171 of the prion protein gene in sheep with natural scrapie [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *76 (Pt 8)*, 2097-2101. https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-8-2097

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, *383*(6602), 685-690. https://doi.org/10.1038/383685a0

Cook, R. W., Bingham, J., Besier, A. S., Bayley, C. L., Hawes, M., Shearer, P. L., . . . Middleton, D. J. (2016). Atypical scrapie in Australia. *Aust Vet J*, *94*(12), 452-455. https://doi.org/10.1111/avj.12529

Cosseddu, G. M., Agrimi, U., Pinto, J., & Schudel, A. A. (2007). Advances in scrapie research. *Rev Sci Tech*, *26*(3), 657-668.

Criado, J. R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J. L., Wills, D. N., Henriksen, S. J., . . . Oldstone, M. B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis*, *19*(1-2), 255-265. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.01.001

Cuillé, J., & Chelle, P. J. C. R. d. l. A. d. S. (1936). The so-called trembling disease of the sheep is inoculable. *203*, 1552-1554.

Dawson, M., Moore, R. C., & Bishop, S. C. (2008). Progress and limits of PrP gene selection policy. *Vet Res*, *39*(4), 25. https://doi.org/10.1051/vetres:2007064

Dawson, M., Wells, G. A., Parker, B. N., & Scott, A. C. (1990). Primary parenteral transmission of bovine spongiform encephalopathy to the pig. *Vet Rec*, *127*(13), 338.

De Bosschere, H., Roels, S., Benestad, S. L., & Vanopdenbosch, E. (2004). Scrapie case similar to Nor98 diagnosed in Belgium via active surveillance. *Vet Rec*, *155*(22), 707-708. https://doi.org/10.1136/vr.155.22.707

De Vries, F., Hamann, H., Drögemüller, C., Ganter, M., & Distl, O. (2005). Analysis of associations between the prion protein genotypes and production traits in East Friesian milk sheep. *J Dairy Sci*, *88*(1), 392-398. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72699-0

Debeer, S. O., Baron, T. G., & Bencsik, A. A. (2001). Immunohistochemistry of PrPsc within bovine spongiform encephalopathy brain samples with graded autolysis. *J Histochem Cytochem*, *49*(12), 1519-1524. https://doi.org/10.1177/002215540104901205

DeSilva, U., Guo, X., Kupfer, D. M., Fernando, S. C., Pillai, A. T., Najar, F. Z., . . . Roe, B. A. (2003). Allelic variants of ovine prion protein gene (PRNP) in Oklahoma sheep [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cytogenet Genome Res*, *102*(1-4), 89-94. https://doi.org/75731

Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., . . . Moynagh, J. (2001). Screening slaughtered cattle for BSE. *Nature*, *409*(6819), 476-478. https://doi.org/10.1038/35054134

Detwiler, L. A., & Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, *22*(1), 121-143. https://doi.org/10.20506/rst.22.1.1386

Dickinson, A. G., & Outram, G. W. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp*, *135*, 63-83. https://doi.org/10.1002/9780470513613.ch5

Douet, J. Y., Zafar, S., Perret-Liaudet, A., Lacroux, C., Lugan, S., Aron, N., . . . Andreoletti, O. (2014). Detection of infectivity in blood of persons with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg Infect Dis*, *20*(1), 114-117. https://doi.org/10.3201/eid2001.130353

Drögemüller, C., Leeb, T., & Distl, O. (2001). PrP genotype frequencies in German breeding sheep and the potential to breed for resistance to scrapie. *Vet Rec*, *149*(12), 349-352. https://doi.org/10.1136/vr.149.12.349

Eloit, M., Adjou, K., Coulpier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., . . . Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, *156*(16), 523-524. https://doi.org/10.1136/vr.156.16.523-b

Elsen, J. M., Amigues, Y., Schelcher, F., Ducrocq, V., Andreoletti, O., Eychenne, F., . . . Laplanche, J. L. (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol*, *144*(3), 431-445. https://doi.org/10.1007/s007050050516

Epstein, V., Pointing, S., & Halfacre, S. (2005). Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Vet Rec*, *157*(21), 667-668. https://doi.org/10.1136/vr.157.21.667-c

Ersdal, C., Ulvund, M. J., Espenes, A., Benestad, S. L., Sarradin, P., & Landsverk, T. (2005). Mapping PrPSc propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol*, *42*(3), 258-274. https://doi.org/10.1354/vp.42-3-258

Espinosa, J. C., Herva, M. E., Andréoletti, O., Padilla, D., Lacroux, C., Cassard, H., . . . Torres, J. M. (2009). Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie. *Emerg Infect Dis*, *15*(8), 1214-1221. https://doi.org/10.3201/eid1508.081218

Espinosa, J. C., Marín-Moreno, A., Aguilar-Calvo, P., Benestad, S. L., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2021). Porcine Prion Protein as a Paradigm of Limited Susceptibility to Prion Strain Propagation. *J Infect Dis*, *223*(6), 1103-1112. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz646

Everest, S. J., Ramsay, A. M., Chaplin, M. J., Everitt, S., Stack, M. J., Neale, M. H., . . . Terry, L. A. (2011). Detection and localisation of PrP(Sc) in the liver of sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One*, *6*(5), e19737. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019737

Evoniuk, J. M., Johnson, M. L., Borowicz, P. P., Caton, J. S., Vonnahme, K. A., Reynolds, L. P., . . . Redmer, D. A. (2008). Effects of nutrition and genotype on prion protein (PrPC) gene expression in the fetal and maternal sheep placenta. *Placenta*, *29*(5), 422-428. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.02.003

Fediaevsky, A., Gasqui, P., Calavas, D., & Ducrot, C. (2010). Discrepant epidemiological patterns between classical and atypical scrapie in sheep flocks under French TSE control measures. *Vet J*, *185*(3), 338-340. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.06.019

Fediaevsky, A., Morignat, E., Ducrot, C., & Calavas, D. (2009). A case-control study on the origin of atypical scrapie in sheep, France. *Emerg Infect Dis*, *15*(5), 710-718. https://doi.org/10.3201/eid1505.081119

Filali, H., Vidal, E., Bolea, R., Márquez, M., Marco, P., Vargas, A., . . . Badiola, J. J. (2013). Gene and protein patterns of potential prion-related markers in the central nervous system of clinical and preclinical infected sheep. *Vet Res*, *44*(1), 14. https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-14

Foster, J. D., Goldmann, W., & Hunter, N. (2013). Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS One*, *8*(11), e79433. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079433

Foster, J. D., 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*(6), 165-171. https://doi.org/10.1136/vr.148.6.165

Fraser, H. (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull*, *49*(4), 792-809. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072647

Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*, *78*(3), 301-311. https://doi.org/10.1016/0021-9975(68)90006-6

Garza, M. C., Fernández-Borges, N., Bolea, R., Badiola, J. J., Castilla, J., & Monleón, E. (2011). Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One*, *6*(12), e27525. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027525

Garza, M. C., Monzon, M., Marin, B., Badiola, J. J., & Monleon, E. (2014). Distribution of peripheral PrP(Sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PLoS One*, *9*(5), e97768. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097768

Gavier-Widén, D., Stack, M. J., Baron, T., Balachandran, A., & Simmons, M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest*, *17*(6), 509-527. https://doi.org/10.1177/104063870501700601

Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., & Anderson, R. M. (2002). The transmission dynamics of BSE and vCJD. *C R Biol*, *325*(1), 37-47. https://doi.org/10.1016/s1631-0691(02)01389-6

Gielbert, A., Davis, L. A., Sayers, A. R., Hope, J., Gill, A. C., & Sauer, M. J. (2009). High-resolution differentiation of transmissible spongiform encephalopathy strains by quantitative N-terminal amino acid profiling (N-TAAP) of PK-digested abnormal prion protein. *J Mass Spectrom*, *44*(3), 384-396. https://doi.org/10.1002/jms.1516

Goldmann, W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res*, *39*(4), 30. https://doi.org/10.1051/vetres:2008010

Goldmann, W., Houston, F., Stewart, P., Perucchini, M., Foster, J., & Hunter, N. (2006). Ovine prion protein variant A(136)R(154)L(168)Q(171) increases resistance to experimental challenge with bovine spongiform encephalopathy agent [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Gen Virol*, *87*(Pt 12), 3741-3745. https://doi.org/10.1099/vir.0.82083-0

Goldmann, W., Hunter, N., Benson, G., Foster, J. D., & Hope, J. (1991). Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *Journal of General Virology*, *72 (Pt 10)*, 2411-2417. https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2411

Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K., & Hope, J. (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep [Comparative StudyResearch Support, Non-U.S. Gov't]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(7), 2476-2480. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1969635

Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J., & Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *75 (Pt 5)*, 989-995. https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-989

Gombojav, A., Ishiguro, N., Horiuchi, M., & Shinagawa, M. (2004). Unique amino acid polymorphisms of PrP genes in Mongolian sheep breeds [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Vet Med Sci*, *66*(10), 1293-1295. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15528869

González, L., Martin, S., Hawkins, S. A., Goldmann, W., Jeffrey, M., & Sisó, S. (2010). Pathogenesis of natural goat scrapie: modulation by host PRNP genotype and effect of co-existent conditions. *Vet Res*, *41*(4), 48. https://doi.org/10.1051/vetres/2010020

González, L., Martin, S., Houston, F. E., Hunter, N., Reid, H. W., Bellworthy, S. J., & Jeffrey, M. (2005). Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. *J Gen Virol*, *86*(Pt 3), 827-838. https://doi.org/10.1099/vir.0.80299-0

González, L., Martin, S., & Jeffrey, M. (2003). Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol*, *84*(Pt 5), 1339-1350. https://doi.org/10.1099/vir.0.18800-0

González, L., Pitarch, J. L., Martin, S., Thurston, L., Moore, J., Acín, C., & Jeffrey, M. (2014). Identical pathogenesis and neuropathological phenotype of scrapie in valine, arginine, glutamine/valine, arginine, glutamine sheep infected experimentally by the oral and conjunctival routes. *J Comp Pathol*, *150*(1), 47-56. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.06.006

Götte, D. R., Benestad, S. L., Laude, H., Zurbriggen, A., Oevermann, A., & Seuberlich, T. (2011). Atypical scrapie isolates involve a uniform prion species with a complex molecular signature. *PLoS One*, *6*(11), e27510. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027510

Gough, K. C., & Maddison, B. C. (2010). Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment. *Prion*, *4*(4), 275-282. https://doi.org/10.4161/pri.4.4.13678

Grassi, J., Maillet, S., Simon, S., & Morel, N. (2008). Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res*, *39*(4), 33. https://doi.org/10.1051/vetres:2008009

Green, D. M., Del Rio Vilas, V. J., Birch, C. P. D., Johnson, J., Kiss, I. Z., McCarthy, N. D., & Kao, R. R. (2007). Demographic risk factors for classical and atypical scrapie in Great Britain. *J Gen Virol*, *88*(Pt 12), 3486-3492. https://doi.org/10.1099/vir.0.83225-0

Greenlee, J. J. (2019). Review: Update on Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. *Vet Pathol*, *56*(1), 6-16. https://doi.org/10.1177/0300985818794247

Greenlee, J. J., Smith, J. D., & Hamir, A. N. (2016). Oral inoculation of neonatal Suffolk sheep with the agent of classical scrapie results in PrP(Sc) accumulation in sheep with the PRNP ARQ/ARQ but not the ARQ/ARR genotype. *Res Vet Sci*, *105*, 188-191. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.016

Gregori, L., Kovacs, G. G., Alexeeva, I., Budka, H., & Rohwer, R. G. (2008). Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerg Infect Dis*, *14*(9), 1406-1412. https://doi.org/10.3201/eid1409.080259

Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, *215*(5105), 1043-1044. https://doi.org/10.1038/2151043a0

Griffiths, P. C., Spiropoulos, J., Lockey, R., Tout, A. C., Jayasena, D., Plater, J. M., . . . Hope, J. (2010). Characterization of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J Gen Virol*, *91*(Pt 8), 2132-2138. https://doi.org/10.1099/vir.0.018986-0

Groschup, M. H., Lacroux, C., Buschmann, A., Lühken, G., Mathey, J., Eiden, M., . . . Andreoletti, O. (2007). Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg Infect Dis*, *13*(8), 1201-1207. https://doi.org/10.3201/eid1308.070077

Groschup, M. H., Weiland, F., Straub, O. C., & Pfaff, E. (1996). Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis*, *3*(3), 191-195. https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0019

Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., & Caughey, B. (2014). Parallel in-register intermolecular β-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*, *289*(35), 24129-24142. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578344

Hamir, A. N., Kunkle, R. A., Greenlee, J. J., & Richt, J. A. (2009). Experimental oral transmission of United States origin scrapie to neonatal sheep. *J Vet Diagn Invest*, *21*(1), 64-68. https://doi.org/10.1177/104063870902100110

Hamir, A. N., Kunkle, R. A., Richt, J. A., Miller, J. M., Cutlip, R. C., & Jenny, A. L. (2005). Experimental transmission of sheep scrapie by intracerebral and oral routes to genetically susceptible Suffolk sheep in the United States. *J Vet Diagn Invest*, *17*(1), 3-9. https://doi.org/10.1177/104063870501700103

Harris, D. A., Lele, P., & Snider, W. D. (1993). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(9), 4309-4313. https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4309

Healy, A. M., Hannon, D., Morgan, K. L., Weavers, E., Collins, J. D., & Doherty, M. L. (2004). A paired case-control study of risk factors for scrapie in Irish sheep flocks. *Prev Vet Med*, *64*(2-4), 73-83. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2004.06.002

Healy, A. M., Weavers, E., McElroy, M., Gomez-Parada, M., Collins, J. D., O'Doherty, E., . . . Doherty, M. L. (2003). The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med*, *17*(6), 908-916. https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02532.x

Heath, C. A., Barker, R. A., Esmonde, T. F., Harvey, P., Roberts, R., Trend, P., . . . Knight, R. S. (2006). Dura mater-associated Creutzfeldt-Jakob disease: experience from surveillance in the UK. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *77*(7), 880-882. https://doi.org/10.1136/jnnp.2005.073395

Heaton, M. P., Leymaster, K. A., Freking, B. A., Hawk, D. A., Smith, T. P., Keele, J. W., . . . Laegreid, W. W. (2003). Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer [Comparative Study]. *Mamm Genome*, *14*(11), 765-777. https://doi.org/10.1007/s00335-003-2283-y

Hedman, C., Bolea, R., Marin, B., Cobriere, F., Filali, H., Vazquez, F., . . . Badiola, J. J. (2016). Transmission of sheep-bovine spongiform encephalopathy to pigs. *Vet Res*, *47*, 14. https://doi.org/10.1186/s13567-015-0295-8

Hedman, C., Lyahyai, J., Filali, H., Marín, B., Serrano, C., Monleón, E., . . . Bolea, R. (2012). Differential gene expression and apoptosis markers in presymptomatic scrapie affected sheep. *Vet Microbiol*, *159*(1-2), 23-32. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.020

Hedman, C., Otero, A., Douet, J. Y., Lacroux, C., Lugan, S., Filali, H., . . . Bolea, R. (2018). Detection of PrPres in peripheral tissue in pigs with clinical disease induced by intracerebral challenge with sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent. *PLoS One*, *13*(7), e0199914. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199914

Heggebø, R., González, L., Press, C. M., Gunnes, G., Espenes, A., & Jeffrey, M. (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, *84*(Pt 5), 1327-1338. https://doi.org/10.1099/vir.0.18874-0

Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *83*(Pt 2), 479-489. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-479

Heggebø, R., Press, C. M., Gunnes, G., Inge Lie, K., Tranulis, M. A., Ulvund, M., . . . Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol*, *81*(Pt 9), 2327-2337. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-9-2327

Herrmann, L. M., Baszler, T. V., & Knowles, D. P. (2000). PrP(c) mRNA, but not PrP(Sc) is found in the salivary glands of scrapie-infected sheep. *Biochim Biophys Acta*, *1479*(1-2), 147-154. https://doi.org/10.1016/s0167-4838(00)00056-x

Hill, A. F. (2003). Possible link between bovine spongiform encephalopathy and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Aust Vet J*, *81*(5), 275-276. https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2003.tb12573.x

Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., . . . Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, *389*(6650), 448-450, 526. https://doi.org/10.1038/38925

Hirogari, Y., Kubo, M., Kimura, K. M., Haritani, M., & Yokoyama, T. (2003). Two different scrapie prions isolated in Japanese sheep flocks. *Microbiol Immunol*, *47*(11), 871-876. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03453.x

Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, *15*(3), 827-852. https://doi.org/10.20506/rst.15.3.959

Hoinville, L. J., Tongue, S. C., & Wilesmith, J. W. (2010). Evidence for maternal transmission of scrapie in naturally affected flocks. *Prev Vet Med*, *93*(2-3), 121-128. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.10.013

Hopp, P., Omer, M. K., & Heier, B. T. (2006). A case-control study of scrapie Nor98 in Norwegian sheep flocks. *J Gen Virol*, *87*(Pt 12), 3729-3736. https://doi.org/10.1099/vir.0.81951-0

Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., & Shinagawa, M. (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol*, *76 (Pt 10)*, 2583-2587. https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-10-2583

Hortells, P., Monzon, M., Monleon, E., Acin, C., Vargas, A., Bolea, R., . . . Badiola, J. J. (2006). Pathological findings in retina and visual pathways associated to natural Scrapie in sheep. *Brain Res*, *1108*(1), 188-194. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.06.021

Houston, E. F., & Gravenor, M. B. (2003). Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet Rec*, *152*(11), 333-334. https://doi.org/10.1136/vr.152.11.333

Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., . . . Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Blood*, *112*(12), 4739-4745. https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-152520

Hoyt, F., Alam, P., Artikis, E., Schwartz, C. L., Hughson, A. G., Race, B., . . . Caughey, B. (2022). Cryo-EM of prion strains from the same genotype of host identifies conformational determinants. *PLoS Pathog*, *18*(11), e1010947. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010947

Hunter, N. (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, *5*(8), 331-334. https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)01081-0

Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., . . . Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *83*(Pt 11), 2897-2905. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2897

Hunter, N., Foster, J. D., Dickinson, A. G., & Hope, J. (1989). Linkage of the gene for the scrapie-associated fibril protein (PrP) to the Sip gene in Cheviot sheep. *Vet Rec*, *124*(14), 364-366. https://doi.org/10.1136/vr.124.14.364

Hunter, N., Goldmann, W., Smith, G., & Hope, J. (1994). Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Vet Rec*, *135*(17), 400-403. https://doi.org/10.1136/vr.135.17.400

Hunter, N., Moore, L., Hosie, B. D., Dingwall, W. S., & Greig, A. (1997). Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet Rec*, *140*(3), 59-63. https://doi.org/10.1136/vr.140.3.59

Huor, A., Espinosa, J. C., Vidal, E., Cassard, H., Douet, J. Y., Lugan, S., . . . Andreoletti, O. (2019). The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *116*(52), 26853-26862. https://doi.org/10.1073/pnas.1915737116

Igel-Egalon, A., Béringue, V., Rezaei, H., & Sibille, P. (2018). Prion Strains and Transmission Barrier Phenomena. *Pathogens*, *7*(1). https://doi.org/10.3390/pathogens7010005

Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M., & Gonzalez, L. (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Comp Pathol*, *127*(4), 264-273. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12443734

Jeffrey, M., & González, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *33*(4), 373-394. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00868.x

Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Holliman, A., Higgins, R. J., Bruce, M. E., McBride, P. A., & Fraser, J. R. (1998). Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec*, *142*(20), 534-537. https://doi.org/10.1136/vr.142.20.534

Jeffrey, M., Martin, S., González, L., Foster, J., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., . . . Hunter, N. (2006). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol*, *134*(2-3), 171-181. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.003

Jeffrey, M., Martin, S., Thomson, J. R., Dingwall, W. S., Begara-McGorum, I., & Gonzalez, L. (2001). Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*, *125*(1), 48-57. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0476 S0021-9975(01)90476-1 [pii]

Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C. M., Brown, K. L., & Bruce, M. E. (2000). Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol*, *191*(3), 323-332. https://doi.org/10.1002/1096-9896(200007)191:3<323::AID-PATH629>3.0.CO;2-Z

Jeffrey, M., Ryder, S., Martin, S., Hawkins, S. A., Terry, L., Berthelin-Baker, C., & Bellworthy, S. J. (2001). Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol*, *124*(4), 280-289. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0465

Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1980). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol*, *51*(Pt 1), 183-187. https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-1-183

Kittelberger, R., Chaplin, M. J., Simmons, M. M., Ramirez-Villaescusa, A., McIntyre, L., MacDiarmid, S. C., . . . O'Keefe, J. S. (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest*, *22*(6), 863-875. https://doi.org/10.1177/104063871002200604

Konold, T., Davis, A., Bone, G., Bracegirdle, J., Everitt, S., Chaplin, M., . . . Simmons, M. M. (2007). Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet Res*, *3*, 2. https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-2

Konold, T., Hawkins, S. A., Thurston, L. C., Maddison, B. C., Gough, K. C., Duarte, A., & Simmons, H. A. (2015). Objects in Contact with Classical Scrapie Sheep Act as a Reservoir for Scrapie Transmission. *Front Vet Sci*, *2*, 32. https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00032

Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., & Simmons, H. A. (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res*, *4*, 14. https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-14

Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Terry, L. A., Thorne, L., Ramsay, A., . . . Simmons, H. A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Vet Res*, *9*, 99. https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-99

Konold, T., Spiropoulos, J., Chaplin, M. J., Thorne, L., Spencer, Y. I., Wells, G. A., & Hawkins, S. A. (2009). Transmissibility studies of vacuolar changes in the rostral colliculus of pigs. *BMC Vet Res*, *5*, 35. https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-35

Konold, T., Spiropoulos, J., Hills, J., Abdul, H., Cawthraw, S., Phelan, L., . . . Torres, J. M. (2023). Experimental transmission of ovine atypical scrapie to cattle. *Vet Res*, *54*(1), 98. https://doi.org/10.1186/s13567-023-01224-3

Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., . . . Oesch, B. (1997). Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*, *390*(6655), 74-77. https://doi.org/10.1038/36337

Kraus, A., Hoyt, F., Schwartz, C. L., Hansen, B., Artikis, E., Hughson, A. G., . . . Caughey, B. (2021). High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions. *Mol Cell*, *81*(21), 4540-4551.e4546. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.08.011

Kretzschmar, H. A. (1993). Neuropathology of human prion diseases (spongiform encephalopathies). *Dev Biol Stand*, *80*, 71-90.

Kübler, E., Oesch, B., & Raeber, A. J. (2003). Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 267-279. https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.267

Lacroux, C., Corbière, F., Tabouret, G., Lugan, S., Costes, P., Mathey, J., . . . Andréoletti, O. (2007). Dynamics and genetics of PrPSc placental accumulation in sheep. *J Gen Virol*, *88*(Pt 3), 1056-1061. https://doi.org/10.1099/vir.0.82218-0

Lacroux, C., Perrin-Chauvineau, C., Corbière, F., Aron, N., Aguilar-Calvo, P., Torres, J. M., . . . Andréoletti, O. (2014). Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats. *J Virol*, *88*(5), 2406-2413. https://doi.org/10.1128/jvi.02872-13

Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., . . . Andréoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, *4*(12), e1000238. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000238

Lacroux, C., Vilette, D., Fernández-Borges, N., Litaise, C., Lugan, S., Morel, N., . . . Andréoletti, O. (2012). Prionemia and leukocyte-platelet-associated infectivity in sheep transmissible spongiform encephalopathy models. *J Virol*, *86*(4), 2056-2066. https://doi.org/10.1128/jvi.06532-11

Lan, Z., Wang, Z. L., Liu, Y., & Zhang, X. (2006). Prion protein gene (PRNP) polymorphisms in Xinjiang local sheep breeds in China [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arch Virol*, *151*(10), 2095-2101. https://doi.org/10.1007/s00705-006-0758-3

Laplanche, J. L., Chatelain, J., Westaway, D., Thomas, S., Dussaucy, M., Brugere-Picoux, J., & Launay, J. M. (1993). PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.]. *Genomics*, *15*(1), 30-37. https://doi.org/10.1006/geno.1993.1006

Lasmézas, C. I. (2003). The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech*, *22*(1), 23-36.

Laude, H., Vilette, D., Le Dur, A., Archer, F., Soulier, S., Besnard, N., . . . Vilotte, J. L. (2002). New in vivo and ex vivo models for the experimental study of sheep scrapie: development and perspectives. *C R Biol*, *325*(1), 49-57. https://doi.org/10.1016/s1631-0691(02)01393-8

Lawson, V. A., Stewart, J. D., & Masters, C. L. (2007). Enzymatic detergent treatment protocol that reduces protease-resistant prion protein load and infectivity from surgical-steel monofilaments contaminated with a human-derived prion strain. *J Gen Virol*, *88*(Pt 10), 2905-2914. https://doi.org/10.1099/vir.0.82961-0

Le Dur, A., Béringue, V., Andréoletti, O., Reine, F., Laï, T. L., Baron, T., . . . Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(44), 16031-16036. https://doi.org/10.1073/pnas.0502296102

Lezmi, S., Bencsik, A., & Baron, T. (2001). CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrPsc accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Vet Immunol Immunopathol*, *82*(1-2), 1-8. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557290

Ligios, C., Cancedda, G. M., Margalith, I., Santucciu, C., Madau, L., Maestrale, C., . . . Heikenwalder, M. (2007). Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS One*, *2*(9), e859. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000859

Ligios, C., Sigurdson, C. J., Santucciu, C., Carcassola, G., Manco, G., Basagni, M., . . . Aguzzi, A. (2005). PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med*, *11*(11), 1137-1138. https://doi.org/10.1038/nm1105-1137

Lindenbaum, S. (2009). Cannibalism, kuru and anthropology. *Folia Neuropathol*, *47*(2), 138-144.

Llewelyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., & Will, R. G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Lancet*, *363*(9407), 417-421. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15486-X

Loiacono, C. M., Thomsen, B. V., Hall, S. M., Kiupel, M., Sutton, D., O'Rourke, K., . . . Keane, D. (2009). Nor98 scrapie identified in the United States. *J Vet Diagn Invest*, *21*(4), 454-463. https://doi.org/10.1177/104063870902100406

Lühken, G., Buschmann, A., Brandt, H., Eiden, M., Groschup, M. H., & Erhardt, G. (2007). Epidemiological and genetical differences between classical and atypical scrapie cases. *Vet Res*, *38*(1), 65-80. https://doi.org/10.1051/vetres:2006046

Lupi, O. (2003). Could ectoparasites act as vectors for prion diseases? *Int J Dermatol*, *42*(6), 425-429. https://doi.org/10.1046/j.1365-4362.2003.00345.x

Lupi, O. (2005). Risk analysis of ectoparasites acting as vectors for chronic wasting disease. *Med Hypotheses*, *65*(1), 47-54. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2005.01.039

Mabbott, N. A., & Bruce, M. E. (2001). The immunobiology of TSE diseases [Review]. *Journal of General Virology*, *82*(Pt 10), 2307-2318. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2307

Maddison, B. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Thorne, L., Bellworthy, S. J., . . . Gough, K. C. (2009). Prions are secreted in milk from clinically normal scrapie-exposed sheep. *J Virol*, *83*(16), 8293-8296. https://doi.org/10.1128/jvi.00051-09

Maddison, B. C., Rees, H. C., Baker, C. A., Taema, M., Bellworthy, S. J., Thorne, L., . . . Gough, K. C. (2010). Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis*, *201*(11), 1672-1676. https://doi.org/10.1086/652457

Madec, J. Y., Belli, P., Calavas, D., & Baron, T. (2000). Efficiency of Western blotting for the specific immunodetection of proteinase K-resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet Rec*, *146*(3), 74-76. https://doi.org/10.1136/vr.146.3.74

Maignien, T., Lasmé Zas, C. I., Beringue, V., Dormont, D., & Deslys, J. P. (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*, *80 (Pt 11)*, 3035-3042. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-3035

Manka, S. W., Zhang, W., Wenborn, A., Betts, J., Joiner, S., Saibil, H. R., . . . Wadsworth, J. D. F. (2022). 2.7 Å cryo-EM structure of ex vivo RML prion fibrils. *Nat Commun*, *13*(1), 4004. https://doi.org/10.1038/s41467-022-30457-7

Manuelidis, L. (2007). A 25 nm virion is the likely cause of transmissible spongiform encephalopathies. *J Cell Biochem*, *100*(4), 897-915. https://doi.org/10.1002/jcb.21090

Marín, B., Otero, A., Lugan, S., Espinosa, J. C., Marín-Moreno, A., Vidal, E., . . . Bolea, R. (2021). Classical BSE prions emerge from asymptomatic pigs challenged with atypical/Nor98 scrapie. *Sci Rep*, *11*(1), 17428. https://doi.org/10.1038/s41598-021-96818-2

Martin, D., Reine, F., Herzog, L., Igel-Egalon, A., Aron, N., Michel, C., . . . Béringue, V. (2021). Prion potentiation after life-long dormancy in mice devoid of PrP. *Brain Commun*, *3*(2), fcab092. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcab092

Martin, T., Hughes, S., Hughes, K., & Dawson, M. (1995). Direct sequencing of PCR amplified pig PrP genes. *Biochim Biophys Acta*, *1270*(2-3), 211-214. https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00041-2

Martins, V. R., & Brentani, R. R. (2002). The biology of the cellular prion protein [Review]. *Neurochem Int*, *41*(5), 353-355. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176078

Martins, V. R., Mercadante, A. F., Cabral, A. L., Freitas, A. R., & Castro, R. M. (2001). Insights into the physiological function of cellular prion protein. *Braz J Med Biol Res*, *34*(5), 585-595. https://doi.org/10.1590/s0100-879x2001000500005

Matsuura, Y., Miyazawa, K., Imamura, M., Yokoyama, T., & Iwamaru, Y. (2019). First case of atypical scrapie in a goat in Japan. *J Vet Med Sci*, *81*(7), 986-989. https://doi.org/10.1292/jvms.18-0710

Matthews, D., & Cooke, B. C. (2003). The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non-ruminant livestock and fish. *Rev Sci Tech*, *22*(1), 283-296. https://doi.org/10.20506/rst.22.1.1393

Meng, L., Zhao, D., Liu, H., Yang, J., & Ning, Z. (2005). Single nucleotide polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Chinese pig breeds. *Xenotransplantation*, *12*(4), 324-326. https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2005.00229.x

Miller, M. W., & Williams, E. S. (2004). Chronic wasting disease of cervids. *Curr Top Microbiol Immunol*, *284*, 193-214. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08441-0_8

Mitchell, G. B., O'Rourke, K. I., Harrington, N. P., Soutyrine, A., Simmons, M. M., Dudas, S., . . . Balachandran, A. (2010). Identification of atypical scrapie in Canadian sheep. *J Vet Diagn Invest*, *22*(3), 408-411. https://doi.org/10.1177/104063871002200310

Mohan, J., Brown, K. L., Farquhar, C. F., Bruce, M. E., & Mabbott, N. A. (2004). Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *J Dermatol Sci*, *35*(2), 101-111. https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2004.05.005

Mohan, J., Bruce, M. E., & Mabbott, N. A. (2005). Follicular dendritic cell dedifferentiation reduces scrapie susceptibility following inoculation via the skin. *Immunology*, *114*(2), 225-234. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02074.x

Monari, L., Chen, S. G., Brown, P., Parchi, P., Petersen, R. B., Mikol, J., . . . et al. (1994). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(7), 2839-2842. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7908444

Monleón, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzón, M., . . . 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*(3-4), 237-243. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.028

Monleón, E., Monzón, M., Hortells, P., Bolea, R., Acín, C., Vargas, F., & Badiola, J. J. (2005). Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods*, *125*(2), 165-171. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.013

Monleón, E., Monzón, M., Hortells, P., Vargas, A., & Badiola, J. J. (2003). Detection of PrP(sc) in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem*, *51*(1), 15-18. https://doi.org/10.1177/002215540305100103

Moore, S. J., 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*(5), 547-559. https://doi.org/10.1007/s00401-008-0433-8

Moore, S. J., West Greenlee, M. H., Kondru, N., Manne, S., Smith, J. D., Kunkle, R. A., . . . Greenlee, J. J. (2017). Experimental Transmission of the Chronic Wasting Disease Agent to Swine after Oral or Intracranial Inoculation. *J Virol*, *91*(19). https://doi.org/10.1128/jvi.00926-17

Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J., & La Bonnardiere, C. (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *82*(Pt 8), 2017-2024. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-2017

Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Moum, T., & Benestad, S. L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol*, *86*(Pt 1), 231-235. https://doi.org/10.1099/vir.0.80437-0

Murayama, Y., Yoshioka, M., Okada, H., Takata, M., Yokoyama, T., & Mohri, S. (2007). Urinary excretion and blood level of prions in scrapie-infected hamsters. *J Gen Virol*, *88*(Pt 10), 2890-2898. https://doi.org/10.1099/vir.0.82786-0

Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drogemuller, C., . . . Seuberlich, T. (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathog*, *3*(6), e82. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030082

O'Rourke, K. I., Duncan, J. V., Logan, J. R., Anderson, A. K., Norden, D. K., Williams, E. S., . . . Sutton, D. L. (2002). Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin Diagn Lab Immunol*, *9*(5), 966-971.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12204945

Okada, H., Miyazawa, K., Imamura, M., Iwamaru, Y., Masujin, K., Matsuura, Y., & Yokoyama, T. (2016). Transmission of atypical scrapie to homozygous ARQ sheep. *J Vet Med Sci*, *78*(10), 1619-1624. https://doi.org/10.1292/jvms.16-0259

Onnasch, H., Gunn, H. M., Bradshaw, B. J., Benestad, S. L., & Bassett, H. F. (2004). Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec*, *155*(20), 636-637. https://doi.org/10.1136/vr.155.20.636

Onodera, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y., & Shinagawa, M. (1993). Isolation of scrapie agent from the placenta of sheep with natural scrapie in Japan. *Microbiol Immunol*, *37*(4), 311-316. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1993.tb03215.x

Orge, L., Galo, A., Machado, C., Lima, C., Ochoa, C., Silva, J., . . . Simas, J. P. (2004). Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol*, *85*(Pt 11), 3487-3491. https://doi.org/10.1099/vir.0.80246-0

Padilla, D., Béringue, V., Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., . . . Torres, J. M. (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog*, *7*(3), e1001319. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001319

Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., . . . et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(23), 10962-10966. https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10962

Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E., & Ironside, J. W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Lancet*, *364*(9433), 527-529. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16811-6

Peden, A. H., Ritchie, D. L., Head, M. W., & Ironside, J. W. (2006). Detection and localization of PrPSc in the skeletal muscle of patients with variant, iatrogenic, and sporadic forms of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*, *168*(3), 927-935. https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.050788

Piel, R. B., 3rd, McElliott, V. R., Stanton, J. B., Zhuang, D., Madsen-Bouterse, S. A., Hamburg, L. K., . . . Schneider, D. A. (2022). PrPres in placental tissue following experimental transmission of atypical scrapie in ARR/ARR sheep is not infectious by Tg338 mouse bioassay. *PLoS One*, *17*(1), e0262766. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0262766

Polak, M. P., Larska, M., Langeveld, J. P., Buschmann, A., Groschup, M. H., & Zmudzinski, J. F. (2010). Diagnosis of the first cases of scrapie in Poland. *Vet J*, *186*(1), 47-52. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.07.032

Prinz, M., Huber, G., Macpherson, A. J., Heppner, F. L., Glatzel, M., Eugster, H. P., . . . Aguzzi, A. (2003). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, *162*(4), 1103-1111. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63907-7

Properzi, F., & Pocchiari, M. (2013). Identification of misfolded proteins in body fluids for the diagnosis of prion diseases. *Int J Cell Biol*, *2013*, 839329. https://doi.org/10.1155/2013/839329

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. https://doi.org/10.1126/science.6801762

Prusiner, S. B. (1996). Transgenetics of prion diseases. *Curr Top Microbiol Immunol*, *206*, 275-304. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85208-4_14

Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13363-13383. https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363

Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., . . . DeArmond, S. J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(22), 10608-10612. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7902565

Race, R., Jenny, A., & Sutton, D. (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis*, *178*(4), 949-953. https://doi.org/10.1086/515669

Race, R., Oldstone, M., & Chesebro, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*, *74*(2), 828-833. https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.828-833.2000

Richardson, E. P., Jr., & Masters, C. L. (1995). The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. *Brain Pathol*, *5*(1), 33-41. https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00575.x

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., & Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, *382*(6587), 180-182. https://doi.org/10.1038/382180a0

Ronzon, F., Bencsik, A., Lezmi, S., Vulin, J., Kodjo, A., & Baron, T. (2006). BSE inoculation to prion diseases-resistant sheep reveals tricky silent carriers. *Biochem Biophys Res Commun*, *350*(4), 872-877. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.09.137

Ru, G. (2017). Do we need to explain the occurrence of atypical scrapie? *Vet Rec*, *180*(16), 400-402. https://doi.org/10.1136/vr.j1893

Ryder, S., Dexter, G., Bellworthy, S., & Tongue, S. (2004). Demonstration of lateral transmission of scrapie between sheep kept under natural conditions using lymphoid tissue biopsy. *Res Vet Sci*, *76*(3), 211-217. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.11.007

Ryder, S. J., Dexter, G. E., Heasman, L., Warner, R., & Moore, S. J. (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res*, *5*, 9. https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-9

Ryder, S. J., Hawkins, S. A., Dawson, M., & Wells, G. A. (2000). The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J Comp Pathol*, *122*(2-3), 131-143. https://doi.org/10.1053/jcpa.1999.0349

Saá, P., Castilla, J., & Soto, C. (2006). Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification. *J Biol Chem*, *281*(46), 35245-35252. https://doi.org/10.1074/jbc.M603964200

Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813. https://doi.org/10.1038/35081095

Safar, J. G., Lessard, P., Tamgüney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., . . . Prusiner, S. B. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis*, *198*(1), 81-89. https://doi.org/10.1086/588193

Salazar, E., Monleón, E., Bolea, R., Acín, C., Pérez, M., Alvarez, N., . . . Luján, L. (2010). Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfected sheep. *Vet Res*, *41*(5), 58. https://doi.org/10.1051/vetres/2010030

Sarradin, P., Melo, S., Barc, C., Lecomte, C., Andréoletti, O., Lantier, F., . . . Gatti, J. L. (2008). Semen from scrapie-infected rams does not transmit prion infection to transgenic mice. *Reproduction*, *135*(3), 415-418. https://doi.org/10.1530/rep-07-0388

Saunders, G. C., Cawthraw, S., Mountjoy, S. J., Hope, J., & Windl, O. (2006). PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J Gen Virol*, *87*(Pt 11), 3141-3149. https://doi.org/10.1099/vir.0.81779-0

Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (1996). Preclinical test for prion diseases. *Nature*, *381*(6583), 563. https://doi.org/10.1038/381563a0

Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec*, *142*(21), 564-568. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9634704

Schulz-Schaeffer, W. J., Tschöke, S., Kranefuss, N., Dröse, W., Hause-Reitner, D., Giese, A., . . . Kretzschmar, H. A. (2000). The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol*, *156*(1), 51-56. https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64705-0

Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol*, *79*(9), 5259-5271. https://doi.org/10.1128/jvi.79.9.5259-5271.2005

Seabury, C. M., & Derr, J. N. (2003). Identification of a novel ovine PrP polymorphism and scrapie-resistant genotypes for St. Croix White and a related composite breed [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cytogenet Genome Res*, *102*(1-4), 85-88. https://doi.org/75730

Seidel, B., Thomzig, A., Buschmann, A., Groschup, M. H., Peters, R., Beekes, M., & Terytze, K. (2007). Scrapie Agent (Strain 263K) can transmit disease via the oral route after persistence in soil over years. *PLoS One*, *2*(5), e435. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000435

Sharpe, A., McElroy, M., Bassett, H., & Sweeney, T. (2006). Clinical and pathological features of experimental scrapie in Irish Blackface Mountain sheep [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Res Vet Sci*, *80*(1), 71-78. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2005.04.005

Sharpe, A., McElroy, M., Langeveld, J. P., Bassett, H., O'Donoghue, A. M., & Sweeney, T. (2005). Immunohistochemical studies of scrapie archival material from Irish ARQ/ARQ sheep for evidence of bovine spongiform encephalopathy-derived disease. *Res Vet Sci*, *79*(1), 29-35. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2004.10.005

Shmakov, A. N., & Ghosh, S. (2001). Prion proteins and the gut: une liaison dangereuse? *Gut*, *48*(4), 443-447. https://doi.org/10.1136/gut.48.4.443

Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 199-212. https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.199

Silva, C. J., Erickson-Beltran, M. L., Martín-Burriel, I., Badiola, J. J., Requena, J. R., & Bolea, R. (2018). Determining the Relative Susceptibility of Four Prion Protein Genotypes to Atypical Scrapie. *Anal Chem*, *90*(2), 1255-1262. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b03985

Simmons, M. M., Konold, T., Simmons, H. A., Spencer, Y. I., Lockey, R., Spiropoulos, J., . . . Clifford, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet Res*, *3*, 20. https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-20

Simmons, M. M., Konold, T., Thurston, L., Bellworthy, S. J., Chaplin, M. J., & Moore, S. J. (2010). The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res*, *6*, 14. https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-14

Simmons, M. M., Moore, S. J., Konold, T., Thurston, L., Terry, L. A., Thorne, L., . . . Spiropoulos, J. (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerg Infect Dis*, *17*(5), 848-854. https://doi.org/10.3201/eid1705.101654

Simmons, M. M., Moore, S. J., Lockey, R., Chaplin, M. J., Konold, T., Vickery, C., & Spiropoulos, J. (2015). Phenotype shift from atypical scrapie to CH1641 following experimental transmission in sheep. *PLoS One*, *10*(2), e0117063. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117063

Siso, S., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2010). Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, *2010*, 747892. https://doi.org/10.1155/2010/747892

Siso, S., Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *35*(3), 232-246. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00978.x

Sisó, S., Jeffrey, M., Steele, P., McGovern, G., Martin, S., Finlayson, J., . . . González, L. (2008). Occurrence and cellular localization of PrPd in kidneys of scrapie-affected sheep in the absence of inflammation. *J Pathol*, *215*(2), 126-134. https://doi.org/10.1002/path.2336

Somerville, R. A., Chong, A., Mulqueen, O. U., Birkett, C. R., Wood, S. C., & Hope, J. (1997). Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, *386*(6625), 564. https://doi.org/10.1038/386564a0

Spagnolli, G., Rigoli, M., Orioli, S., Sevillano, A. M., Faccioli, P., Wille, H., . . . Requena, J. R. (2019). Full atomistic model of prion structure and conversion. *PLoS Pathog*, *15*(7), e1007864. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007864

Spiropoulos, J., Casalone, C., Caramelli, M., & Simmons, M. M. (2007). Immunohistochemistry for PrPSc in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *33*(4), 398-409. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00800.x

Spiropoulos, J., Hawkins, S. A., Simmons, M. M., & Bellworthy, S. J. (2014). Evidence of in utero transmission of classical scrapie in sheep. *J Virol*, *88*(8), 4591-4594. https://doi.org/10.1128/jvi.03264-13

Spiropoulos, J., Lockey, R., Sallis, R. E., Terry, L. A., Thorne, L., Holder, T. M., . . . Simmons, M. M. (2011). Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerg Infect Dis*, *17*(12), 2253-2261. https://doi.org/10.3201/eid1712.110333

St Rose, S. G., Hunter, N., Foster, J. D., Drummond, D., McKenzie, C., Parnham, D., . . . Rhind, S. M. (2007). Quantification of Peyer's patches in Cheviot sheep for future scrapie pathogenesis studies. *Vet Immunol Immunopathol*, *116*(3-4), 163-171. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.017

St Rose, S. G., Hunter, N., Matthews, L., Foster, J. D., Chase-Topping, M. E., Kruuk, L. E., . . . Woolhouse, M. E. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis*, *6*, 5. https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-5

Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L., & Prusiner, S. B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, *32*(8), 1991-2002. https://doi.org/10.1021/bi00059a016

Taylor, D. M. (2003). Preventing accidental transmission of human transmissible spongifom encephalopathies. *Br Med Bull*, *66*, 293-303. https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.293

Taylor, D. M., McConnell, I., & Fraser, H. (1996). Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J Gen Virol*, *77 (Pt 7)*, 1595-1599. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1595

Terry, L. A., Howells, L., Hawthorn, J., Edwards, J. C., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., . . . Everest, S. J. (2009). Detection of PrPsc in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Virol*, *83*(23), 12552-12558. https://doi.org/10.1128/JVI.00311-09

Thackray, A. M., Hopkins, L., Lockey, R., Spiropoulos, J., & Bujdoso, R. (2011). Emergence of multiple prion strains from single isolates of ovine scrapie [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Gen Virol*, *92*(Pt 6), 1482-1491. https://doi.org/10.1099/vir.0.028886-0

Thackray, A. M., Lockey, R., Beck, K. E., Spiropoulos, J., & Bujdoso, R. (2012). Evidence for co-infection of ovine prion strains in classical scrapie isolates [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Comp Pathol*, *147*(2-3), 316-329. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.01.009

Thomzig, A., Kratzel, C., Lenz, G., Krüger, D., & Beekes, M. (2003). Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep*, *4*(5), 530-533. https://doi.org/10.1038/sj.embor.embor827

Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Kratzel, C., Mai, J., & Beekes, M. (2004). Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest*, *113*(10), 1465-1472. https://doi.org/10.1172/jci21083

Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Wrede, A., Wemheuer, W., Brenig, B., Kratzel, C., . . . Beekes, M. (2007). Accumulation of pathological prion protein PrPSc in the skin of animals with experimental and natural scrapie. *PLoS Pathog*, *3*(5), e66. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030066

Thorgeirsdottir, S., Sigurdarson, S., Thorisson, H. M., Georgsson, G., & Palsdottir, A. (1999). PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *80 (Pt 9)*, 2527-2534. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-9-2527

Thorne, L., & Terry, L. A. (2008). In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Journal of General Virology*, *89*(Pt 12), 3177-3184. https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004226-0

Tichopad, A., Didier, A., & Pfaffl, M. W. (2004). Inhibition of real-time RT-PCR quantification due to tissue-specific contaminants. *Mol Cell Probes*, *18*(1), 45-50. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2003.09.001

Tongue, S. C., Wilesmith, J. W., & Cook, C. J. (2004). Frequencies of prion protein (PrP) genotypes and distribution of ages in 15 scrapie-affected flocks in Great Britain. *Vet Rec*, *154*(1), 9-16. https://doi.org/10.1136/vr.154.1.9

Tranulis, M. A., Benestad, S. L., Baron, T., & Kretzschmar, H. (2011). Atypical prion diseases in humans and animals. *Top Curr Chem*, *305*, 23-50. https://doi.org/10.1007/128_2011_161

Tranulis, M. A., Osland, A., Bratberg, B., & Ulvund, M. J. (1999). Prion protein gene polymorphisms in sheep with natural scrapie and healthy controls in Norway. *Journal of General Virology*, *80 (Pt 4)*, 1073-1077. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-4-1073

Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R., & Knowles, D. P. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrPSc accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(9), 6310-6315. https://doi.org/10.1073/pnas.072071199

Tuo, W., Zhuang, D., Knowles, D. P., Cheevers, W. P., Sy, M. S., & O'Rourke, K. I. (2001). Prp-c and Prp-Sc at the fetal-maternal interface. *J Biol Chem*, *276*(21), 18229-18234. https://doi.org/10.1074/jbc.M008887200

Vaccari, G., D'Agostino, C., Nonno, R., Rosone, F., Conte, M., Di Bari, M. A., . . . Agrimi, U. (2007). Prion protein alleles showing a protective effect on the susceptibility of sheep to scrapie and bovine spongiform encephalopathy [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *J Virol*, *81*(13), 7306-7309. https://doi.org/10.1128/JVI.02880-06

Vaccari, G., Petraroli, R., Agrimi, U., Eleni, C., Perfetti, M. G., Di Bari, M. A., . . . Di Guardo, G. (2001). PrP genotype in Sarda breed sheep and its relevance to scrapie. Brief report [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Arch Virol*, *146*(10), 2029-2037. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11722022

van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E., & Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, *34*(5), 1228-1231. https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1228-1231.1996

van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*(16), 57-71. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11214935

van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Dolstra, C. H., Bossers, A., & van Zijderveld, F. G. (2008). Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch Virol*, *153*(3), 445-453. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0007-4

van Keulen, L. J., Vromans, M. E., & van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apmis*, *110*(1), 23-32. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.100104.x

Vargas, F., Bolea, R., Monleón, E., Acín, C., Vargas, A., De Blas, I., . . . Badiola, J. J. (2005). Clinical characterisation of natural scrapie in a native Spanish breed of sheep. *Vet Rec*, *156*(10), 318-320. https://doi.org/10.1136/vr.156.10.318

Vargas, F., Luján, L., Bolea, R., Monleón, E., Martín-Burriel, I., Fernández, A., . . . Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, *20*(1), 187-193. https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[187:daceos]2.0.co;2

Vascellari, M., Nonno, R., Mutinelli, F., Bigolaro, M., Di Bari, M. A., Melchiotti, E., . . . Agrimi, U. (2007). PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol*, *81*(9), 4872-4876. https://doi.org/10.1128/jvi.02148-06

Vázquez-Fernández, E., Vos, M. R., Afanasyev, P., Cebey, L., Sevillano, A. M., Vidal, E., . . . Wille, H. (2016). The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS Pathog*, *12*(9), e1005835. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005835

Vidal, E., Sánchez-Martín, M. A., Eraña, H., Lázaro, S. P., Pérez-Castro, M. A., Otero, A., . . . Castilla, J. (2022). Bona fide atypical scrapie faithfully reproduced for the first time in a rodent model. *Acta Neuropathol Commun*, *10*(1), 179. https://doi.org/10.1186/s40478-022-01477-7

Vidal, E., Tortosa, R., Costa, C., Benavides, J., Francino, O., Sánchez-Robert, E., . . . Pumarola, M. (2008). Lack of PrP(sc) immunostaining in intracranial ectopic lymphoid follicles in a sheep with concomitant non-suppurative encephalitis and Nor98-like atypical scrapie: a case report. *Vet J*, *177*(2), 283-288. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.04.014

Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., . . . Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice

expressing ovine prp. *J Virol*, *75*(13), 5977-5984. https://doi.org/10.1128/jvi.75.13.5977-5984.2001

Vorberg, I., Groschup, M. H., Pfaff, E., & Priola, S. A. (2003). Multiple amino acid residues within the rabbit prion protein inhibit formation of its abnormal isoform. *J Virol*, *77*(3), 2003-2009. https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.2003-2009.2003

Weissmann, C., Raeber, A. J., Montrasio, F., Hegyi, I., Frigg, R., Klein, M. A., & Aguzzi, A. (2001). Prions and the lymphoreticular system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *356*(1406), 177-184. https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0763

Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., . . . Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, *121*(18), 419-420. https://doi.org/10.1136/vr.121.18.419

Wells, G. A. H., Hawkins, S. A. C., Austin, A. R., Ryder, S. J., Done, S. H., Green, R. B., . . . Kimberlin, R. H. (2003). Studies of the transmissibility of the agent of bovine spongiform encephalopathy to pigs. *J Gen Virol*, *84*(Pt 4), 1021-1031. https://doi.org/10.1099/vir.0.18788-0

Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C. M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A. L., . . . Prusiner, S. B. (1994). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie [Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.]. *Genes Dev*, *8*(8), 959-969. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7926780

Weström, B., Arévalo Sureda, E., Pierzynowska, K., Pierzynowski, S. G., & Pérez-Cano, F. J. (2020). The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol*, *11*, 1153. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01153

Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., & Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec*, *128*(9), 199-203. https://doi.org/10.1136/vr.128.9.199

Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, *123*(25), 638-644.

Will, R., & Zeidler, M. (1996). Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. *Bmj*, *313*(7061), 833-834. https://doi.org/10.1136/bmj.313.7061.833

Wilson, D. R., Anderson, R. D., & Smith, W. (1950). Studies in scrapie. *J Comp Pathol*, *60*(4), 267-282. https://doi.org/10.1016/s0368-1742(50)80025-5

Wrathall, A. E. (1997). Risks of transmitting scrapie and bovine spongiform encephalopathy by semen and embryos. *Rev Sci Tech*, *16*(1), 240-264. https://doi.org/10.20506/rst.16.1.1016

Wrathall, A. E., Brown, K. F., Sayers, A. R., Wells, G. A., Simmons, M. M., Farrelly, S. S., . . . Fraser, H. (2002). Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Rec*, *150*(12), 365-378. https://doi.org/10.1136/vr.150.12.365

Wrathall, A. E., Holyoak, G. R., Parsonson, I. M., & Simmons, H. A. (2008). Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology*, *70*(5), 725-745. https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.05.049

Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., . . . Collinge, J. (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report [Case Reports Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Lancet*, *368*(9552), 2061-2067. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69835-8

Zhang, L., Li, N., Fan, B., Fang, M., & Xu, W. (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Anim Genet*, *35*(6), 457-461. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01204.x