

ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) es una enfermedad neurológica mortal del ganado bovino adulto (*Bos taurus* y *B. indicus*), que fue reconocida por primera vez en el Reino Unido (RU) y que se ha identificado en forma clásica (EEB de tipo C) y en formas atípicas (tipos H y L). Tanto la forma de tipo C como las formas atípicas se han detectado en ganado bovino originario de la mayoría de países europeos, las Américas y Asia y el Pacífico. La EEB es una encefalopatía espongiforme transmisible (EET) o enfermedad causada por priones. El arquetipo de este grupo de enfermedades es el prurigo lumbar de las ovejas y las cabras (véase el capítulo 3.7.11. Prurigo lumbar).

La epizootia causada por la EEB de tipo C deriva de una exposición oral a priones de las proteínas derivadas de rumiantes de las harinas de carne y hueso y de las leches reconstituidas incluidas como ingredientes de los piensos para los animales. Gracias a las medidas de control, las epizootias de EEB de tipo C están en declive. Se considera que las formas atípicas de la EEB tienen lugar de forma espontánea en todas las poblaciones de ganado bovino a una tasa muy baja, y solo se han detectado en ganado de edad avanzada. Se han identificado en muchos países, pero solo como hallazgo casual durante procesos de vigilancia intensiva de la EEB de tipo C.

Se ha demostrado la transmisibilidad experimental de todas las formas de la EEB al ganado bovino. Se sospecha que el agente de la EEB de tipo C es la fuente común, por la vía alimentaria, de EET en otras especies de rumiantes y de félicos. Existen indicios de una relación causal entre el agente causante de la EEB y la variante Creutzfeldt-Jakob (vECJ), del ser humano. Las recomendaciones para el manejo de material infectado con EEB parten de la base de que la EEB es una zoonosis y de que las manipulaciones con material que pueda estar contaminado deben realizarse a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico.

Detección del agente: La EEB de tipo C clínica tiene un pico de incidencia en el ganado bovino de entre 4 y 5 años durante la parte álgida de la epizootia. La duración clínica es variable pero puede prolongarse hasta durar varios meses. Los signos clínicos manifiestos son característicos si pueden descartarse los demás diagnósticos diferenciales. Los primeros síntomas clínicos pueden ser sutiles y principalmente conductuales, y pueden llevar a la eliminación de animales afectados antes de que se dispare la sospecha de EEB. En países con una política establecida contra la enfermedad, los animales clínicamente sospechosos deben sacrificarse, analizarse los encéfalos y destruirse las correspondientes canales. Hoy en día, en la mayoría de países la vigilancia activa que se lleva a cabo en los mataderos y el cribado del ganado sacrificado permite la detección de los casos clínicos y preclínicos en los que puedan haber pasado desapercibidos los signos clínicos. Actualmente, no se dispone de ninguna prueba de diagnóstico para animales vivos.

En la patogenia de la enfermedad, presenta una importancia crítica una isoforma de una proteína de membrana PrP^c, originalmente denominada PrP^{Sc}, que es específica de la enfermedad y parcialmente resistente a las proteasas. Según la hipótesis del prión, PrP^{Sc} constituye el único o el principal componente del agente infeccioso. El diagnóstico se confirma mediante la detección inmunohistoquímica (IHC) y/o inmunoquímica de PrP^{Sc} en tejido encefálico. Esta discriminación de los fenotipos atípicos respecto al tipo clásico de la EEB se logra mediante un patrón en bandas por inmunoelectrotransferencia y caracterización por bioanálisis.

En muchos países se utilizan kits comerciales; de forma similar, un conjunto de anticuerpos anti-PrP constituye la base de muchos métodos de diagnóstico. Algunos se comercializan, o bien

pueden obtenerse en los Laboratorios de Referencia de la OIE u otros laboratorios con programas activos de vigilancia contra las EET.

Pruebas serológicas: En las EET no se han detectado respuestas inmunitarias específicas.

Requisitos para las vacunas: No se dispone de ninguna vacuna.

A. INTRODUCCIÓN

Para obtener información actualizada sobre la distribución de la enfermedad, por favor consulte la Base de Datos de Información Zoonosaria de la OIE¹.

1. Descripción de la enfermedad

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB), una enfermedad mortal del ganado bovino (*Bos taurus* y *B. indicus*) causada por priones puede cursar clínicamente con signos de enfermedad del sistema nervioso central, como temor, hiperreactividad y ataxia. El diagnóstico se confirma a partir de una detección postmórtem, mediante IHC o inmunquímica, de proteínas priónicas mal plegadas en el encéfalo.

La transmisión de la EEB clásica (de tipo C) tiene lugar por el consumo de harinas de carne y hueso contaminadas por priones de la EEB o por el consumo de piensos que contienen estas harinas (Wells y Wilesmith, 1995). No existen indicios de transmisión horizontal y pocos datos respaldan la transmisión materna (Prince *et al.*, 2003). Los datos epidemiológicos y los estudios de transmisión experimental indican que el periodo de incubación es de al menos 2 años y que puede alargarse más de una década. El curso de la enfermedad suele ser entre subagudo y crónico, y los animales afectados presentan signos neurológicos progresivos. No existe un tratamiento efectivo y si se deja que la enfermedad que siga su curso, los animales afectados inevitablemente mueren.

La EEB clínica del tipo C tiene lugar en el ganado bovino adulto (de entre 20 meses y 22 años en el Reino Unido). Durante la epidemia principal, la mayoría de casos se observaron en ganado bovino lechero de entre 4 y 6 años. Posteriormente, se ha observado el impacto de los eficaces controles en un aumento de la edad de aparición de la enfermedad clínica. La EEB aparece de forma aparentemente benigna y normalmente un curso que avanza lentamente (Konold *et al.*, 2004; Wilesmith *et al.*, 1992). En ocasiones, habrá un caso con signos agudos y a continuación se deteriorará rápidamente, aunque la frecuencia de observación es un factor importante para determinar los primeros signos clínicos. Los signos iniciales, aunque son variables suelen consistir en cambios de comportamiento y de carácter, hiperreactividad y falta de coordinación. Las vacas afectadas podrían ser reacias a entrar en la sala de ordeño o bien dar enérgicas coces durante el ordeño, lo cual suele ser el primer signo observado. En el caso de las vacas secas en concreto, una falta de coordinación y debilidad en las patas traseras puede ser el primer signo clínico detectado. Los signos nerviosos observados con más frecuencia han sido el temor, la ataxia de los miembros pelvianos y la hiperestesia al tacto y al sonido. Los sobresaltos ante estímulos externos, repetibles, son frecuentes y por tanto se utilizan para respaldar el diagnóstico clínico en los casos en que se sospecha de EEB (Konold *et al.*, 2004). Las vacas afectadas a veces llevarán la cabeza baja y el cuello extendido al estar de pie, y arquearán el lomo o separarán las patas traseras. También es posible observar un temblor de la cabeza. Las anomalías de la marcha, como la falta de coordinación o la hipermetría, a menudo se limitan a las patas traseras y se aprecian más fácilmente al observar el ganado bovino pastando. A medida que avanza la intensidad de los signos locomotores, una debilidad generalizada, que da lugar a caídas y decúbito, puede dominar el cuadro clínico. Los signos nerviosos a menudo cursan con rasgos clínicos generales de pérdida de condición corporal y reducción de la producción de leche a medida que la enfermedad avanza. No se han producido cambios en el cuadro clínico de la EEB de tipo C a lo largo del curso de la epizootia del RU (Konold *et al.*, 2004; Wilesmith *et al.*, 1992). Los signos clínicos son básicamente similares en otros países en los que ha tenido lugar EEB de tipo C. El curso clínico largo, que suele durar semanas o meses, terminaría requiriendo el desvieje por motivos de bienestar animal. Sin embargo, una política establecida por ley para determinar el estatus de un país en relación con la EEB exige la declaración obligatoria y la investigación diagnóstica de los casos clínicamente sospechosos, así como su desvieje y examen post-mortem del encéfalo. Al inicio del curso de la enfermedad, los signos pueden ser sutiles, variables e inespecíficos, y por tanto pueden impedir el diagnóstico clínico en una exploración inicial. La observación continuada de estos casos ambiguos, junto con procedimientos adecuados de anatomopatología clínica para eliminar diagnósticos diferenciales, sobre todo trastornos metabólicos, permitirán establecer el avance de los signos. Algunos síntomas tempranos de la EEB pueden mostrar similitudes con rasgos de cetosis nerviosa, hipomagnesemia, listeriosis encefálica y otras enfermedades del sistema nervioso central. Los signos sutiles a veces se pueden exacerbar debido al estrés, como el causado por el transporte.

1 <https://www.oie.int/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animales/recopilacion-de-datos-sobre-enfermedades/>

Se pueden descargar videos de ganado bovino afectado por EEB de la web del Laboratorio de Referencia de la OIE para la EEB que se encuentra en el RU², que también proporciona imágenes en formato electrónico previo pedido.

Se sabe poco acerca de la presentación clínica de la EEB atípica que tiene lugar de forma natural, puesto que la mayoría de estos casos se detectan mediante una vigilancia activa del ganado bovino que muere o que está aparentemente sano, y no se sabe cuál es la correlación entre los datos de las pruebas de laboratorio para el diagnóstico y los estados clínicos de los animales. Una característica frecuente interesante es que prácticamente solo se han detectado casos de EEB atípica en ganado bovino de más de 8 años. Los datos de la inoculación intracerebral experimental de ganado bovino indican que los signos clínicos de la EEB de tipo H y de tipo L pueden incluir los observados en la EEB de tipo C, pero que la falta de energía y la dificultad para levantarse también son características importantes de la presentación clínica de estos animales (Konold *et al.*, 2012).

2. El agente patógeno

Sin un agente causal aislable, los casos solo se pueden confirmar de manera definitiva post-mortem mediante observación de la acumulación, en el sistema nervioso central (SNC) de proteína anómala de prión (PrP^{Sc}, PrP^d o PrP^{res}), una isoforma parcialmente resistente a la proteasa de una proteína codificada por el hospedador (PrP^C). La hipótesis del prión propone que el agente está formado totalmente por PrP^{Sc}, que es capaz de inducir conversión de PrP^C. La caracterización anatomopatológica y mediante bioanálisis mostró que la epidemia estaba causada por una sola cepa, y el hecho de obtener resultados siempre característicos en la neurohistopatología y en las pruebas moleculares de detección de la PrP^{Sc} en animales afectados clínicamente constituyó el criterio de definición de un caso de EEB de tipo C. Desde 2003, informes de una anatomopatología y/o de unas características moleculares distintas en ganado bovino viejo de varios países han indicado una variación de la cepa del agente causal (Biacabe *et al.*, 2004; Casalone *et al.*, 2004).

Hasta ahora, en más de 100 casos de EEB atípica se ha observado, mediante inmunoelectrotransferencia, que difieren en cuanto a sus perfiles moleculares respecto a la EEB de tipo C. Los datos del bioanálisis respaldan la hipótesis de que estas cepas son, desde el punto de vista biológico, claramente distintas de las de la EEB de tipo C (Beringue *et al.*, 2006; Lombardi *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2011). Las dos formas atípicas se definen funcionalmente como BASE (encefalopatía espongiforme amiloidótica bovina) o EEB de tipo L y de tipo H en función de que la masa del fragmento de PrP^{Sc} no glucosilado sea inferior o superior, respectivamente, a la que se observa, mediante inmunoelectrotransferencia, en la EEB de tipo C (Casalone *et al.*, 2004; Jacob *et al.*, 2007).

3. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

La aparición de una variante de la enfermedad denominada de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en seres humanos se ha asociado a la ingesta de EEB de tipo C (Bruce *et al.*, 1997). No se sabe si los casos atípicos están relacionados, desde el punto de vista causal, con formas de enfermedades priónicas humanas. Las precauciones de seguridad recomendadas para manipular el agente se basan en el supuesto de que todas las formas de la EEB son zoonóticas. Las medidas de biocontención para las necropsias y la manipulación de tejido deben basarse en un análisis del riesgo y cumplir la normativa nacional pertinente; todo procedimiento que genere aerosoles debe llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y contención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*), y el laboratorio debe cumplir con la normativa nacional de bioseguridad y biocontención para proteger a los operarios de la exposición al agente patógeno. La inactivación física recomendada es la que tiene lugar por esterilización en autoclave de carga porosa a 134°C–138°C durante 18 minutos a 30 lb/in² (208 kPa o 2,2 bar). No obstante, la inactivación total no podrá lograrse en ciertas condiciones, como cuando el material analizado está en forma de macerado, en caso de título alto o cuando el agente está envuelto de materia orgánica desecada. La desinfección de posibles fómites se lleva a cabo utilizando hipoclorito de sodio que contenga un 2% de cloro disponible, o con hidróxido de sodio 2N, aplicado durante más de 1 hora a 20°C en el caso de las superficies, o durante toda la noche en el caso del equipo.

4. Diagnóstico diferencial

Para el diagnóstico diferencial, deben tenerse en cuenta todos los tipos de enfermedades neurológicas del ganado bovino, como la encefalitis infecciosa, trastornos metabólicos (cetosis, hipomagnesemia), intoxicaciones, neoplasias y traumatismos.

2 <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/>

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la encefalopatía espongiforme bovina y sus propósitos

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de circulación del virus en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente³						
Inmuno-histoquímica	–	–	++	+++	++	–
Inmuno-electro-transferencia	–	–	++	+++	++	–
Pruebas rápidas de cribado	–	–	+++	+	+++	–

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

1. Detección del agente

No existe ningún método útil para confirmar la presencia de EEB en el animal vivo. La identificación del "agente" empieza con la sospecha clínica de la enfermedad, o bien con la demostración post-mortem de alteraciones histopatológicas o de una acumulación de PrP^{Sc} en un animal sospechoso o en un animal no sospechoso mediante programas de vigilancia activa. La naturaleza del "agente" en sí sigue siendo hipotética, y por tanto no puede aislarse con fines de diagnóstico. Sin embargo, está ampliamente aceptado que la PrP^{Sc} es un marcador fiable de la enfermedad, y, a excepción de la exploración física y de la histopatología, todos los métodos actuales de diagnóstico se basan en poner de manifiesto esta proteína.

En ausencia de métodos *in-vitro* para el aislamiento del agente causal, la enfermedad se puede confirmar mediante la observación de la vacuolización característica específica de la EEB mediante histopatología en distintos niveles del encéfalo. El no observar lesiones por métodos histopatológicos no excluye una acumulación de PrP^{Sc}. El diagnóstico histopatológico basado en el examen de un solo corte del bulbo raquídeo (a nivel del óbex) se validó frente a un examen más extenso del tronco encefálico. Este sistema simplificado permite el muestreo de encéfalo extraído por el *foramen magnum* (agujero occipital), utilizando instrumental adaptado en lugar de la extracción de todo el encéfalo. No obstante, se recomienda utilizar métodos inmunohistoquímicos de detección de la PrP específica de la enfermedad, como técnicas de IHC e inmunoelectrotransferencia con el fin de confirmar el diagnóstico y mejorar la sensibilidad en los casos tempranos o autolisados. Los métodos *in-vitro* más rápidos, como el enzimoanálisis (ELISA) para la detección de la PrP^{Sc} ha conllevado gran variedad de pruebas "rápidas", que ahora constituyen las principales herramientas de detección sistemática para la vigilancia activa. Este tipo de pruebas proporcionan un diagnóstico preliminar, cuyos resultados positivos o inconcluyentes se someten a exámenes mediante IHC o a métodos confirmativos por inmunoelectrotransferencia. Las pruebas rápidas actualmente constituyen el principal método de detección de casos y se ha llegado al acuerdo de que se utilicen más como parte del proceso confirmativo, siempre que una de las dos pruebas utilizadas sea la inmunoelectrotransferencia⁴. Todas las formas de EEB actualmente reconocibles son detectables mediante estos métodos, aunque no se ha llevado a cabo una evaluación completa de la sensibilidad y la especificidad respecto a las formas atípicas (tipos H y L).

La elección de cualquier método en concreto dependerá del contexto en el que se utilice. Los contextos abarcan desde la confirmación de casos clínicos sospechosos a la detección sistemática de indicios de enfermedad subclínica o preclínica en poblaciones sanas. La definición de caso adoptada también diferirá en función de si el

³ Se recomienda aplicar una combinación de varios métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

⁴ https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/OIE%20rules%20for%20BSE%20using%20a%20second%20rapid%20test_Rev_Jan2019.pdf

método de diagnóstico va a aplicarse para confirmación o para detección. Debe tenerse cuidado con la interpretación de los datos de diagnóstico cuando se utilizan metodologías que no permiten una referencia cruzada con los estándares para el diagnóstico confirmativo que se definen aquí. Sin una comparación adecuada con criterios publicados previamente que definan el fenotipo de la EEB, y en ausencia de estudios de transmisión, los resultados de diagnóstico que defiendan la identificación de una nueva cepa pueden ser prematuros. El control de calidad (QC) y la garantía de calidad (GC) son partes fundamentales de los procedimientos analíticos y puede pedirse consejo a los Laboratorios de Referencia de la OIE. Tanto si los animales infectados por EEB se identifican mediante vigilancia pasiva como si se identifican mediante vigilancia activa, es aconsejable detectar y confirmar la enfermedad mediante una combinación de al menos dos métodos analíticos. La prueba principal puede ser uno de los métodos analíticos confirmativos descritos abajo o una prueba rápida, pero es importante aplicar una prueba secundaria para confirmar un posible resultado positivo o inconcluyente de la prueba principal. Cuando hay un conflicto entre los resultados de las pruebas principal y secundaria, deben aplicarse otras pruebas utilizando inmunohistoquímica o inmunoelectrotransferencia, o bien deben enviarse las muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE para su resolución.

1.1. Preparación de la muestra

El estatus de un país respecto a la EEB, la implementación relativa de programas de vigilancia pasiva y activa y los métodos de diagnóstico aplicados influirán en la estrategia de muestreo.

En todas las circunstancias de vigilancia pasiva de la enfermedad neurológica en el ganado bovino adulto **cuando no se haya establecido la aparición de EEB en un país o estado o la incidencia sea baja**, se recomienda someter los casos clínicamente sospechosos a un enfoque neuropatológico estándar en el que se muestree todo el encéfalo, y se examinen partes representativas de todo el encéfalo. El ganado bovino sospechoso de tener la enfermedad debe sacrificarse con una inyección intravenosa de una solución de barbitúrico concentrado precedida, si es necesario, de sedación. El encéfalo debe extraerse cuanto antes tras la muerte, por los métodos estándar. No existen lesiones macroscópicas asociadas a la EEB, de modo que si se observa alguna al extraer el encéfalo, estas deberán muestrearse específicamente para facilitar el diagnóstico diferencial.

Debe tenerse cuidado de conservar muestras de encéfalo fijadas y frescas adecuadas para la detección de PrP^{Sc} mediante inmunohistoquímica y mediante inmunquímica. El incumplimiento de este enfoque de toma y conservación de todo el encéfalo podría impedir la adecuada caracterización del caso, para confirmar si es o no típico de la EEB.

Se llevan a cabo exámenes mediante histopatología e IHC inicialmente con un bloque único (0,5–1,0 cm de espesor) del bulbo raquídeo cortado a nivel del óbex (Fig. 1a y b, nivel A-A que representa el centro del bloque para el examen), que debe fijarse durante un mínimo de 3-5 días (en función del espesor del bloque) en solución del formaldehído al 4% (es decir, solución salina con formol al 10% o formalina normal tamponada al 10% [NBF]). Para disminuir la infectividad, los tejidos fijados se pueden sumergir en ácido fórmico al 98% durante 1 hora para reducir la infectividad priónica, y lavarse a continuación, durante 30 minutos, en agua de grifo. Es importante tener en cuenta que ello puede reducir la variedad de pruebas posteriores que podrían ser necesarias para la clasificación a no ser que también se disponga de material congelado. El posterior procesamiento histológico debe realizarse mediante métodos convencionales de inclusión en parafina para tejido neural. (Un ejemplo de métodos adecuados de procesamiento puede hallarse en TSEglobalNet⁵).

Inicialmente debe tomarse material fresco para la inmunodetección de PrP^{Sc} en forma de semicorte del bulbo raquídeo a nivel del óbex, o en forma de corte coronal completo (2–4 g), inmediatamente rostral, o caudal, al bloque de óbex tomado para la fijación. Todas las demás zonas del encéfalo deben subdividirse mediante un corte paramediano sagital (3–5 mm alejado de la mediana). La parte menor se guarda para la detección de la PrP^{Sc} mediante métodos inmunquímicos (como la inmunoelectrotransferencia) y se guarda congelada antes del análisis (si el análisis no se realiza de inmediato tras el muestreo). Tras el muestreo de la zona del óbex para la fijación y del muestreo de tejido fresco, la parte más grande del tejido encefálico se coloca, de hecho, en unos 4–6 litros del fijador formalina al 10%, que deben cambiarse dos veces a la semana. Tras la fijación durante 2 semanas, si es necesaria más investigación, pueden realizarse cortes coronales del encéfalo. Puede reducirse el tiempo de fijación cortando en trozos transversales más pequeños el tronco encefálico fresco (separado del resto del encéfalo), de forma similar a la extracción inicial de la región del óbex, pero dejando intactas las áreas transversales que son importantes para el diagnóstico a nivel de los pedúnculos cerebelares y los tubérculos cuadrigéminos superiores (figura 1a y b. niveles B–B y C–C, respectivamente). En función de otros factores (temperatura, agitación, espesor del bloque de tejido, utilización de microondas) el tiempo de fijación de estos trozos más pequeños de encéfalo puede

5 <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/confirmatory-diagnosis.html>

reducirse. No obstante, la evaluación de los efectos de estos tipos de procesos de fijación acelerada en los protocolos posteriores de IHC tiene que satisfacer los estándares de eficiencia analítica. Las otras partes del encéfalo fijadas en formol pueden utilizarse para el diagnóstico diferencial tras terminar la fijación estándar de 2 semanas.

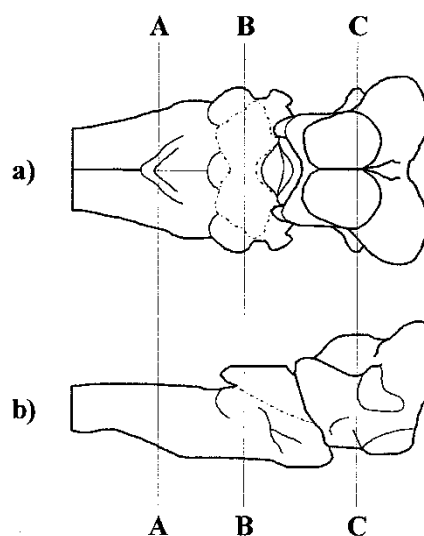


Fig 1. El tronco encefálico tras retirar el cerebelo, caras a) dorsal, y b) lateral.
Niveles recomendados a los que deben tomarse los cortes:
A–A = bulbo raquídeo, en el óbex; B–B = bulbo raquídeo a través de los pedúnculos cerebelares caudales;
C–C = mesencéfalo a través de los tubérculos cuadrigéminos superiores.

Cuando en un país en particular se detecta la presencia de EEB en la población de ganado bovino autóctono, con evidencias de que la distribución de las lesiones y otros determinantes fenotípicos coinciden con los descritos para la EEB clásica, a efectos de confirmación y control de la enfermedad es adecuado, aunque no ideal, extraer tan solo el tronco encefálico.

Esto puede realizarse por el agujero occipital sin extraer la bóveda craneal (Fig. 2). Esto reducirá la cantidad de fijador necesario y el tiempo y equipo exigidos, disminuyendo así los costes y mejorando la seguridad. De esta forma se pueden mantener las principales zonas objeto del examen histológico. Este método permite recoger y examinar un gran número de muestras para la vigilancia pasiva o para un programa de vigilancia activa en mataderos y en animales que hallados muertos. El tronco encefálico se disecciona por el agujero occipital sin abrir el cráneo por medio de un instrumento en forma de cuchara especialmente diseñado, con bordes afilados alrededor del cuenco poco profundo. Este tipo de instrumentos se comercializan. Es posible que sean necesarias variaciones en la técnica, como la orientación, en función de las distintas formas de instrumental, y es importante formar a los técnicos sobre la utilización del equipo convenido. Esta formación deberá incluir información sobre de la distribución de la PrP^{Sc} en los cortes transversales del tronco encefálico, y la necesidad de realizar un muestreo exacto y de conservar las zonas objeto de diagnóstico (véase abajo).

Cuando el caso inicial se identifique mediante una vigilancia activa, probablemente no se disponga de las zonas encefálicas necesarias para una completa caracterización fenotípica. En la mayoría de países, solo se toma el tronco encefálico, incluso antes de que se confirme por primera vez la EEB. Deben guardarse cabezas muestreadas en el curso de la vigilancia activa hasta que se conozcan los resultados de las primeras pruebas. Ello permitiría un muestreo exhaustivo del encéfalo de animales positivos en retrospectiva para la caracterización de casos. Esto es especialmente importante si se utilizan pruebas internas que no están sujetas a una garantía de calidad externa y cuando, en ausencia de una comparación directa con los métodos aquí descritos, se dice que se han identificado nuevos fenotipos. Cuando se utilizan inmunoanálisis rápidos como herramienta principal de vigilancia, es necesario disponer de material para una posterior inmunohistoquímica, incluidos exámenes morfológicos y moleculares, los cuales permitirían la identificación del fenotipo de la enfermedad en ausencia de un diagnóstico de EEB previo en ese país.

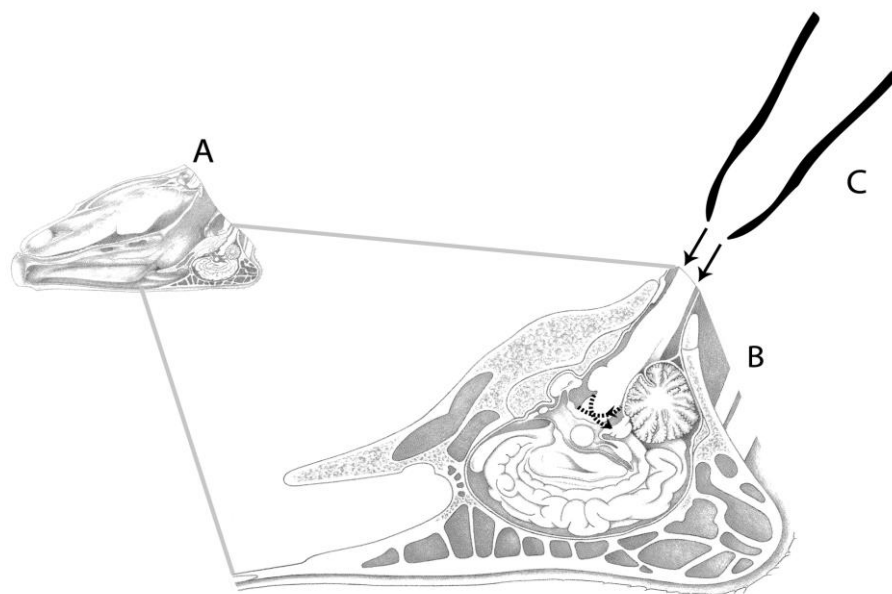


Fig. 2. Después de separar la cabeza del cuerpo mediante un corte entre la vértebra atlas y los cóndilos occipitales del cráneo, se coloca en un soporte con la superficie ventral hacia arriba (A), con el extremo caudal del tronco encefálico (bulbo raquídeo) visible por el agujero occipital (véase B, un dibujo ampliado del cráneo). Se inserta el instrumento (C) a través del agujero occipital entre la duramadre y la cara ventral/dorsal (dependiendo del enfoque específico) del bulbo raquídeo y se desplaza hacia adelante en sentido craneal, manteniendo la parte convexa del instrumento apoyada contra el hueso craneal y realizando con ella un movimiento rotatorio de un lado a otro. Con ello se separan las raíces de los nervios craneales sin dañar el tejido encefálico. De este modo se hace avanzar al instrumento en sentido rostral hasta una distancia de aproximadamente 7 cm en esa dirección y luego se realiza un movimiento angular abrupto (es decir, hacia el plano dorsal/ventral del tronco encefálico, dependiendo del enfoque) cortando y separando el tronco encefálico (con algunos fragmentos del cerebelo) del resto del encéfalo. El instrumento, que se mantiene en ángulo, a continuación se retira del cráneo para extraer el tejido por el agujero occipital.

1.1.1. Muestreo del tronco encefálico para la vigilancia activa mediante pruebas rápidas

El muestreo y procesamiento de tejido encefálico para uso en pruebas rápidas debe ajustarse estrictamente a las especificaciones proporcionadas por el proveedor o fabricante del método o kit de la prueba. Los detalles de ese procedimiento varían de un método a otro, pero tales cambios no deben aplicarse sin datos de validación facilitados por el fabricante que avalen la variación de la metodología. La muestra preferida para el enzimoimmunoanálisis debe estar en el óbex o a 1,0 cm de distancia anterior o posterior del mismo, situado en la zona anteroposterior a los lugares clave a estudiar (Fig. 3) para la demostración de cúmulos de PrP^{Sc} y la evaluación del muestreo para las pruebas rápidas. Al elegir el punto objeto de estudio es necesario tener en cuenta el siguiente método de confirmación. Debe mantenerse intacto al menos un semicorte del bulbo raquídeo a nivel del óbex para la fijación para la inmunohistoquímica/histología (como se describe anteriormente) por si un resultado positivo requiere confirmación. El muestreo del bulbo raquídeo anterior o posterior al óbex para las pruebas rápidas no compromete el examen mediante histología o IHC. Sin embargo, para obtener muestras comparables para las pruebas rápidas y confirmativas, es preferible un muestreo mediante semicorte del bulbo raquídeo a nivel del óbex. A pesar de la consecuente pérdida de capacidad de evaluación de la simetría de cualquier lesión histopatológica (considerable vacuolación), este enfoque es menos probable que comprometa el examen mediante IHC, que es más importante. No obstante, si se opta por un semicorte, es fundamental garantizar que los puntos objeto de estudio no queden comprometidos en ninguna muestra. Por ejemplo, el núcleo solitario y el núcleo motor dorsal del nervio vago (zonas objeto de estudio para las lesiones del ganado bovino con EEB) son pequeños, y quedan relativamente cerca de la línea media (Fig. 3). Si el tejido muestreado se autolisa hasta el punto de que no es posible orientarse anatómicamente, puede tomarse y analizarse una alícuota sin

identificar. En estos casos, un resultado positivo sigue siendo un resultado válido, pero un resultado negativo no indicará que el animal es negativo, y deberá interpretarse con cautela y comunicarse con la adecuada cualificación.

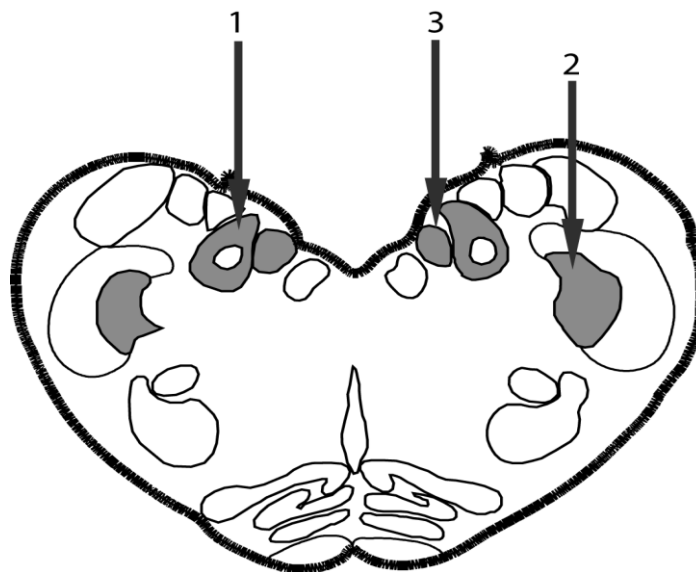


Fig 3. Corte transversal del tronco encefálico bovino a nivel del óbex identificando los puntos clave objeto de estudio para el diagnóstico mediante histopatología e inmunohistoquímica en la EEB. Son principalmente el tracto solitario [1] y el núcleo de la vía medular del nervio trigémino [2]; pero también el núcleo motor dorsal del nervio vago [3]. Por tanto, el material tomado para la aplicación de una prueba rápida también debe incluir estas zonas.

Un semicorte inexacto puede conllevar la pérdida total de una zona objeto de estudio para la prueba confirmativa, y podría comprometer un programa de vigilancia. Una mala colocación de las herramientas de muestreo correspondientes también podría conllevar un muestreo inadecuado de las zonas objeto de estudio. Por tanto, estos enfoques deben implementarse con una política muy clara y un programa de seguimiento para la formación y la garantía de calidad de los procedimientos de muestreo, incluida la posición anatómica, y no solo el peso de la muestra. Debido a la distribución específicamente buscada de PrP^{Sc}, el tamaño y ubicación de la muestra deben ser los descritos en el kit de diagnóstico o, si no se especifica, al menos deben tomarse 0,5 g de las zonas objeto de estudio diagnóstico para todas las pruebas confirmativas, como se detalla en la Fig. 3. Las características de rendimiento de las pruebas podrían resultar comprometidas por la autólisis, en concreto debido a la pérdida de capacidad de garantía de inclusión de las zonas objeto de estudio en la muestra tomada para el diagnóstico.

1.2. Examen diagnóstico

1.2.1. Examen histológico

En este capítulo se menciona la histopatología debido a su importancia histórica, ya que fue el primer método empleado para el diagnóstico de las EET y sigue permitiendo la identificación de lesiones causadas por EET, es decir, vacuolas y placas. No obstante, estas lesiones aparecen tras la formación de formas de PrP específicas de enfermedad durante el curso de la enfermedad. Como consecuencia, la histopatología tiene menor sensibilidad que los métodos de identificación del agente y ha sido sustituida por estos. Asimismo, este método de diagnóstico requiere una buena conservación de la muestra, mientras que los métodos de diagnóstico de PrP específicas de enfermedad se ven menos afectados por la autólisis.

La histopatología por sí sola ya no es el método diagnóstico de elección para el estudio de animales sospechosos ni para la detección de casos en poblaciones sanas. Sin embargo, es importante tener en cuenta las alteraciones histopatológicas, a fin de facilitar la detección de casos durante la realización de exámenes histológicos para el diagnóstico sistemático de encéfalos bovinos muestreados por motivos distintos de las pruebas de EEB. Para el diagnóstico diferencial, se realizan cortes de bulbo raquídeo-óbex de 5 µm de espesor y se tiñen con hematoxilina y eosina (H/E). Si la calidad del tejido lo permite, el examen histopatológico de cortes teñidos con H/E permite la confirmación de las alteraciones

neuropatológicas de la EEB (Simmons *et al.*, 1996; Wells y Wilesmith, 1995) mediante el cual la enfermedad se detectó por primera vez como encefalopatía espongiiforme. Esos cambios influyen, sobre todo, en el cambio espongiiforme y la vacuolización neuronal, y son muy similares a los de otras EET de los animales, pero la frecuente vacuolización neuroparenquimatosa en ciertos núcleos anatómicos del bulbo raquídeo a nivel del óbex proporciona una forma satisfactoria de establecer un diagnóstico histopatológico con un solo corte de bulbo raquídeo. Como en otras especies, las alteraciones vacuolares del encéfalo bovino, en concreto las vacuolas del interior de los pericariones de los núcleos rojo y oculomotor del mesencéfalo son un hallazgo casual (Gavier-Widen *et al.*, 2001). Por tanto, el diagnóstico histopatológico de la EEB debe basarse en la mera presencia de neuronas vacuoladas, en concreto en estas ubicaciones anatómicas.

Con independencia del diagnóstico histopatológico, se recomienda que también se utilice sistemáticamente la inmunohistoquímica, ya que estudios no publicados sugieren que incluso un 5% de los casos clínicos sospechosos (que son negativos para alteraciones vacuolares en el óbex según el examen de los cortes teñidos con H/E) pueden diagnosticarse mediante examen por IHC. Es evidente que el examen del bulbo raquídeo-óbex no permite un examen neuropatológico completo para el diagnóstico diferencial, ni permite una caracterización fenotípica exhaustiva de ninguna EET. Por ello, se recomienda tomar encéfalos enteros de todos los casos clínicos sospechosos. Todavía no se dispone de datos suficientes para describir las características histopatológicas concretas de la EEB tipo H o L. En la BASE (EEB tipo L) se dispone de algunos datos histológicos de investigadores italianos (Casalone *et al.*, 2004). En la vigilancia pasiva se encuentran unos pocos casos atípicos de EEB y no se pueden obtener encéfalos enteros en la vigilancia activa para aumentar nuestros conocimientos en este campo. El mal estado del encéfalo del ganado que ha muerto en la explotación, entre el cual se han identificado la mayoría de casos atípicos, también descarta un examen histológico completo por los efectos de la autólisis. Se ha descrito la anatomopatología de la fase terminal de la EEB de tipo H y de tipo L experimental en un pequeño número de animales tras la inoculación intracerebral (Konold *et al.*, 2014; Okada *et al.*, 2011).

Aunque el examen histopatológico ha sido sustituido por otros métodos de diagnóstico, sigue resultando un método de investigación útil como prueba tanto primaria como de confirmación.

1.2.2. Detección de formas de PrP específicas de la enfermedad

La utilización universal de métodos de detección de la PrP proporciona un medio de diagnóstico de la enfermedad concreta independiente de las alteraciones morfológicas definidas por histopatología. La detección de acumulaciones de PrP^{Sc} es el enfoque de elección para los programas de vigilancia y el diagnóstico confirmativo. Es posible (aunque no deseable) llevar a cabo una inmunohistoquímica para la PrP con material que se haya congelado antes de la fijación (Debeer *et al.*, 2002). La congelación previa a la fijación no comprometerá la inmunoreactividad de una muestra, pero podría comprometer la identificación de las zonas objeto de estudio. Un caso positivo dará positivo en el inmunomarcaje específico de enfermedad (Casalone *et al.*, 2006) en al menos una de las zonas objeto de las pruebas diagnósticas. Para diagnosticar un caso como negativo, debe ser posible identificar la presencia de las zonas objeto de estudio y demostrar que la ejecución de la IHC funcionaba técnicamente en controles adecuados. Si no hay inmunomarcaje específico de la enfermedad, y no pueden identificarse zonas objeto de estudio, el caso se deberá clasificar como “no confirmado”, por oposición a negativo. Tanto las variantes tipo H como las variantes tipo L presentan acumulación de PrP^{Sc} en el bulbo raquídeo a nivel del óbex (Casalone *et al.*, 2006; Konold *et al.*, 2012). El intervalo y el aspecto morfológico del inmunomarcaje por todo el eje cerebromedular difieren respecto a la EEB clásica, y la presencia de múltiples depósitos pequeños de tipo placa que constituyen un rasgo frecuente de las formas variantes. Las diferencias en el tronco encefálico (óbex) no siempre son pronunciadas, y no resultan fiables para diferenciar o clasificar los casos.

1.2.2.1. Métodos inmunohistoquímicos (IHC)

La determinación de una acumulación de PrP^{Sc} mediante IHC se lleva a cabo en el mismo material incluido en parafina y fijado en formalina que el utilizado para el diagnóstico histopatológico. Se han aplicado con éxito distintos protocolos a la detección de PrP^{Sc} mediante IHC para el diagnóstico de la EEB y aunque parecería deseable disponer de un método de IHC estandarizado, podría ser más importante reconocer métodos robustos que logren un resultado estandarizado, ya que se realiza un seguimiento de los mismos mediante la participación en ejercicios de análisis de la eficiencia, y mediante la comparación con los resultados de un método modelo estandarizado en un Laboratorio de Referencia. La técnica genérica establecida para la histopatología sigue aplicándose y

funciona bien en tejidos autolisados en los que ya no puede realizarse una evaluación morfológica (Monleon *et al.*, 2003). No obstante, es indispensable reconocer la anatomía de la muestra para determinar si contiene o no zonas objeto de estudio. Esto es crucial para un diagnóstico negativo, y también podría ser fundamental para interpretar correctamente un inmunomarcaje dudoso. La detección de acumulaciones de PrP^{Sc} mediante IHC tiene una sensibilidad cercana a la de la inmunoelectrotransferencia para la detección de PrP^{Sc} (Schaller *et al.*, 1999). Junto con unas buenas preparaciones histológicas, la inmunohistoquímica permite la detección de acumulaciones de PrP^{Sc} y estas, como la patología vacuolar, presenta un patrón de distribución y un aspecto típicos. Esto permite la evaluación o confirmación simultánea de este aspecto del fenotipo de la enfermedad. En los Laboratorios de Referencia de la OIE se dispone de los métodos actuales.

Contrariamente a lo que ocurre con el diagnóstico del prurigo lumbar de las ovejas, la escasa detección de PrP^{Sc} en tejidos linfoides en la EEB no proporciona ninguna oportunidad de utilizar este tipo de tejidos para el diagnóstico preclínico mediante biopsia.

1.2.2.2. Inmunoelectrotransferencia

Las técnicas de inmunoelectrotransferencia se llevan a cabo con tejido fresco (sin fijar), y pueden aplicarse con éxito incluso cuando el tejido está autolisado (Hayashi *et al.*, 2004). La inmunoelectrotransferencia SAF (Stack *et al.*, 2004) fue el primero de este tipo de métodos utilizado en el diagnóstico de la EEB. Tiene una sensibilidad diagnóstica similar a la de las técnicas de IHC, y sigue siendo el método de elección, junto con la inmunohistoquímica, para la confirmación de la EEB. Es un método muy sensible cuando se utiliza una gran masa (lo ideal es que sea de entre 2 y 4 g) del material de partida, y varios pasos para concentrar la PrP^{Sc}. Ahora se dispone de métodos alternativos más rápidos y baratos. Estos precisan menos material y son más prácticos. En TSEglobalNet⁶ y en Laboratorios de Referencia de la OIE para la EEB distintos del del Reino Unido están disponibles varios métodos de inmunoelectrotransferencia.

Aunque actualmente la metodología de la inmunoelectrotransferencia en general se utiliza en todo el mundo, cuando se utiliza para detectar PrP^{Sc} la sensibilidad analítica varía de forma importante entre métodos y laboratorios. Cuando a efectos de confirmación del diagnóstico se prefieren métodos internos a los publicados, es importante que se evalúen para comprobar si son adecuados para el fin deseado y que se validen previa consulta a un Laboratorio de Referencia de la OIE.

Los Laboratorios de Referencia de la OIE y nacionales han establecido métodos de inmunoelectrotransferencia para discriminar entre las variantes de tipo H y de tipo L y la EEB clásica. Esta discriminación se basa en la diferencia en cuanto a la segmentación N terminal de la proteinasa K, la reactividad humoral y el patrón de glucosilación de PrP^{res} (Jacob *et al.*, 2007). El Laboratorio de Referencia de la Unión Europea ha lanzado un protocolo detallado que incluye criterios de diagnóstico y que puede consultarse online en TSEglobalNet⁷.

1.2.2.3. Métodos analíticos rápidos

Se han elaborado técnicas de inmunoelectrotransferencia, pruebas de flujo lateral y ELISA rápidos que permiten analizar un gran número de muestras de encéfalo y que se comercializan. Estas técnicas se pueden ejecutar en pocas horas (véanse las evaluaciones EC de pruebas rápidas para la detección de EEB realizadas en grupos de muestras que se sabía que eran positivas o negativas según la IHC⁸. Las pruebas que se han evaluado y aprobado para la vigilancia de la EEB dentro de la UE se detallan en el punto 4 del Capítulo C del Anexo X del Reglamento sobre las EET (Reglamento CE nº 999/2001 y enmiendas siguientes⁹). En la página web del Laboratorio de Referencia de la OIE del Reino Unido se detalla el método de utilización de estas pruebas¹⁰.

Aunque muchos países, así como un Grupo *ad hoc* de la OIE sobre pruebas de EEB, aceptan la aprobación de la UE como indicador del rendimiento analítico, otros han establecido sus propios mecanismos de evaluación, entre los que destacan EE.UU.,

6 <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/index.html>

7 <http://www.tse-lab-net.eu/documents/tse-rl-blot.pdf>

8 <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/test.html>

9 <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1591112973636&uri=CELEX:02001R0999-20191214>

10 <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/tse-oie-guide.pdf>

Canadá y Japón (protocolos de Canadá para la vigilancia de la EEB¹¹; Descripción del Sistema de Regulación de los Medicamentos Veterinarios de Japón; Laboratorio Nacional para Pruebas Veterinarias del Ministerio de Agricultura, Bosques y Pesca de Japón¹²). La OIE también dispone de un proceso de aprobación, y los protocolos para estas evaluaciones se indican en la página web de la OIE: Validación y certificación de Pruebas de Diagnóstico¹³), y el proceso de aprobación por parte de la UE se ha aceptado como método de referencia para futuras evaluaciones por su sensibilidad y especificidad.

No se han comparado por completo las sensibilidades de las pruebas rápidas, la inmunohistoquímica y otros métodos confirmativos porque, por definición, no todas las pruebas pueden aplicarse a muestras idénticas, y la distribución anatómica de la PrP^{Sc} es variable. (Existe el acuerdo de que pueden utilizarse homogenados de tejido o mezclas de tejido finamente troceado y proporcionar cierta información, para determinados tipos de pruebas). Reconocer esto es especialmente importante al evaluar el rendimiento de las pruebas rápidas cuando se analizan animales que no presentan signos clínicos de EEB y probablemente tienen depósitos de PrP^{Sc} más pequeños y restringidos que el ganado bovino con la enfermedad más avanzada. Las pruebas rápidas proporcionan un medio de detección inicial para animales que se encuentran en los últimos meses del periodo de incubación (Arnold *et al.*, 2007), por ejemplo en estudios de material post-mortem recogido de ganado bovino sacrificado de la forma habitual. En países que llevan a cabo vigilancia para la detección de casos nuevos de EEB y en los que se considera necesario un medio de evaluación de la prevalencia de la EEB independiente del sistema de notificación de casos sospechosos, estas pruebas de detección ofrecen un enfoque eficiente. Desde su introducción para la detección activa en Europa desde enero de 2001, estas pruebas han sido las responsables de la identificación de la mayoría de animales infectados por EEB y constituyen la prueba principal de elección. No obstante, la confirmación de un diagnóstico de EEB teóricamente requiere el examen de encéfalo fijado mediante inmunohistoquímica o la aplicación de un protocolo de inmunoelectrotransferencia adecuado. En 2006, la OIE aceptó que mediante su utilización en programas de vigilancia activa, las pruebas rápidas comerciales han demostrado ser muy eficaces y constantes, siempre que se lleven a cabo por parte de personal adecuadamente formado. Ciertamente, a veces pueden ser superiores a las pruebas estándar reconocidas para la comparación si la formación y la experiencia relativas a estas últimas son deficientes. En tales circunstancias, ahora se considera aceptable, a efectos del diagnóstico, aunque no sea lo ideal para la caracterización, utilizar las pruebas rápidas tanto para la detección primaria en programas de vigilancia activa o pasiva como para la posterior confirmación. No obstante, es fundamental asegurarse de que la elección de las pruebas principal y secundaria son compatibles, y no suponen riesgo de generar falsos positivos por el hecho de compartir reactivos. Como consecuencia, en TSEglobalNet se mantendrán publicadas cuáles son las combinaciones analíticas de preferencia, con el fin de ayudar a los que deseen utilizar este enfoque en lugar de la inmunohistoquímica, o bien la inmunoelectrotransferencia para la confirmación. La combinación de pruebas debe incluir un método de inmunoelectrotransferencia para generar datos complementarios útiles que ayudarán en la caracterización fenotípica de la muestra en ausencia de un examen de tejido fijado. La confirmación debe llevarse a cabo en un Laboratorio de Referencia Nacional.

La combinación de las dos pruebas rápidas solo puede utilizarse para la confirmación de un caso de EEB. Un resultado negativo en la prueba secundaria es insuficiente para definir un caso como negativo tras un resultado positivo en la prueba principal. Por tanto, los casos sospechosos de EEB con resultados discordantes en la prueba rápida deben volver a analizarse mediante la inmunoelectrotransferencia o IHC para demostrar la PrP^{Sc} o, en el caso de que no se disponga de estos métodos, las muestras deben enviarse a un Laboratorio de Referencia de la OIE para que vuelvan a ser analizadas.

Aunque los programas de evaluación de las pruebas llevados a cabo en Europa se realizaron para respaldar la legislación europea sobre vigilancia de la EEB, las consecuencias también son importantes para otros países. Las consecuencias de los falsos positivos o negativos son tan importantes que la introducción de pruebas nuevas debe estar respaldada por una exhaustiva evaluación del rendimiento de las mismas. Las pretensiones de los fabricantes deben basarse en datos, evaluados preferiblemente por terceros. Es importante destacar que el proceso de validación completa de todos estos

11 <http://www.inspection.gc.ca/english/anima/disemala/bseesb/surv/protoce.shtml>

12 <http://www.maff.go.jp/nval/english/pdf/outline130325.pdf>

13 <https://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/registro-de-los-kits-de-diagnostico/informacion-general/>

métodos de diagnóstico de la EEB ha sido limitado debido a la falta de un verdadero método de referencia y la consecuente necesidad de aplicar estándares de comparación basados en estudios relativamente pequeños. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de publicación de estudios a mayor escala de rendimiento de las pruebas, y ninguno de los datos publicados hasta ahora se puede equiparar con procedimientos reconocidos de validación de las pruebas utilizadas para otras enfermedades.

1.3. Otras pruebas de diagnóstico

Puede demostrarse infectividad por EEB mediante inoculación de ratones con tejido encefálico de ganado bovino afectado y en fase terminal, pero el bioanálisis no es práctico para el diagnóstico sistemático por el largo periodo de incubación. Sin embargo, en ausencia de un agente físico aislable, es el enfoque más cercano a un método de referencia para la caracterización de las cepas el que tiene que basarse en las propiedades biológicas secundarias en un hospedador estandarizado. Los ratones transgénicos, como los que sobreexpresan el gen bovino de la PrP, ofrecen bioanálisis con periodos de incubación cortos para la EEB, pero hasta ahora ninguno de ellos constituye una herramienta práctica de diagnóstico.

Se está comprobando que los métodos en los que se emplea la amplificación de proteína *in vitro* son muy sensibles para la detección de ciertas enfermedades priónicas (Castilla *et al.*, 2006; Orru *et al.*, 2012), incluida la EEB de tipo C (Murayama *et al.*, 2010), pero todavía no se han evaluado formalmente para la aplicación en sistemas de vigilancia reglamentarios, aunque algunas ya se han utilizado, con buenos resultados, en sistemas piloto de vigilancia de la enfermedad humana (Lacroux *et al.*, 2014; Orru *et al.*, 2014).

1.4. Disponibilidad de reactivos y kits de diagnóstico

Como se ha explicado anteriormente (apartado B.1.2.2.3, arriba), se han autorizado kits de diagnóstico para su uso en muchos países, y se comercializan reactivos, que también pueden adquirirse en Laboratorios de Referencia de la OIE y otros que dispongan de un programa de vigilancia de EET. Los laboratorios deben utilizar preferiblemente los kits indicados en la lista del Registro¹⁴ de la OIE, o bien otros siempre que las autoridades reguladoras correspondientes los hayan evaluado exhaustivamente y validado.

2. Pruebas serológicas

Los agentes infecciosos de enfermedades causadas por priones no inducen una respuesta inmunitaria importante en el hospedador, de tal modo que no pueden aplicarse métodos serológicos.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

ARNOLD M.E., RYAN J.B.M., KONOLD T., SIMMONS M.M., SPENCER Y.I., WEAR A., CHAPLIN M., STACK M., CZUB S., MUELLER R., WEBB P.R., DAVIS A., SPIROPOULOS J., HOLDAWAY J., HAWKINS S.A.C., AUSTIN A.R. & WELLS G.A.H. (2007). Estimating the temporal relationship between PrP^{Sc} detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE) of cattle. *J. Gen. Virol.*, **88**, 3198–3208.

ARNOLD M.E., RYAN J.B.M., KONOLD T., SIMMONS M.M., SPENCER Y.I., WEAR A., CHAPLIN M., STACK M., CZUB S., MUELLER R., WEBB P.R., DAVIS A., SPIROPOULOS J., HOLDAWAY J., HAWKINS S.A.C., AUSTIN A.R. & WELLS G.A.H. (2007). Estimating the temporal relationship between PrP^{Sc} detection and incubation period in experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE) of cattle. *J. Gen. Virol.*, **88**, 3198–3208.

BERINGUE V., BENCSIK A., LE DUR A., REINE F., LAI T.L., CHENAIS N., TILLY G., BIACABE A.-G., BARON T., VILOTTE J.-L. & LAUDE H. (2006). Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathogens*, **2**, 956–963.

14 <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/productos-veterinarios/kits-de-agnostico/>

BIACABE A.G., LAPLANCHE J.L., RYDER S. & BARON T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep.*, **5**, 110–115.

BRUCE M.E., WILL R.G., IRNSIDE J.W., MCCONNELL I., DRUMMOND D., SUTTIE A., MCCARDLE L., CHREE A., HOPE J., BIRKETT C., COUSENS S., FRASER H. & BOSTOCK C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498–501.

CASALONE C., CARAMELLI M., CRESCIO M.I., SPENCER Y.I. & SIMMONS M.M. (2006). BSE immunohistochemical patterns in the brainstem: a comparison between UK and Italian cases. *Acta Neuropathol.*, **111**, 444–449.

CASALONE C., ZANUSSO G., ACUTIS P., FERRARI S., CAPUCCI L., TAGLIAVINI F., MONACO S. & CARAMELLI M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Cruetzfeldt-Jacob disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 3065–3670.

CASTILLA J., SAA 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.

DEBEER S.O.S., BARON T.G.M. & BENCSIK A.A. (2002). Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrP immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 611–616.

GAVIER-WIDEN D., WELLS G.A.H., SIMMONS M.M., WILESMITH J.W. & RYAN J.B.M. (2001). Histological observations on the brains of symptomless 7-year-old cattle. *J. Comp. Path.*, **124**, 52–59.

HAYASHI H., TAKATA M., IWAMARU Y., USHIKI Y., KIMURA K.M., TAGAWA Y., SHINAGAWA M. & YOKOYAMA T. (2004). Effect of tissue deterioration on postmortem BSE diagnosis by immunobiochemical detection of an abnormal isoform of prion protein. *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 515–520.

JACOB J.G., LANGEVELD J.P.M., BIACABE A.-G., ACUTIS P.-L., POLAK M.P., GAVIER-WIDEN D., BUSCHMANN A., CARAMELLI M., CASALONE C., MAZZA M., GROSCHUP M., ERKENS J.H.F., DAVIDSE A., VAN ZIJDERVELD F.G. & BARON T. (2007). Molecular discrimination of atypical Bovine Spongiform Encephalopathy strains in a geographical region spanning a wide area in Europe. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 1821–1829.

KONOLD T., BONE G.E., CLIFFORD D., CHAPLIN M.J., CAWTHRAW S., STACK M.J. & SIMMONS M.M. (2012). Experimental H-type and L-type bovine spongiform encephalopathy in cattle: observation of two clinical syndromes and diagnostic challenges. *BMC Vet. Res.* **8**, 22.

KONOLD T., BONE G., RYDER S., HAWKINS S.A., COURTIN F. & BERTHELIN-BAKER C. (2004). Clinical findings in 78 suspected cases of bovine spongiform encephalopathy in Great Britain. *Vet. Rec.*, **155**, 659–666.

KONOLD T., PHELAN L.J., CLIFFORD D., CHAPLIN M.J., CAWTHRAW S., STACK M.J. & SIMMONS M.M. (2014). The pathological and molecular but not clinical phenotypes are maintained after second passage of experimental atypical bovine spongiform encephalopathy in cattle. *BMC Vet. Res.* **10**, 243.

LACROUX C., COMOY E., MOUDJOU M., PERRET-LIAUDET A., LUGAN S., LITAISE C., SIMMONS H., JAS-DUVAL C., LANTIER I., BÉRINGUE V., GROSCHUP M., FICHET G., COSTES P., STREICHENBERGER N., LANTIER F., DESLYS J.P., VILETTE D. & ANDRÉOLETTI O. (2014). Preclinical detection of variant CJD and BSE prions in blood. *PLoS Pathog.*, **10**:e1004202.

LOMBARDI G., CASALONE C., D'ANGELO A., GELMETTI D., TORCOLI G., BARBIERI I., CORONA C., FASOLI E., FARINAZZO A., FIORINI M., GELATI M., IULINI B., TAGLIAVINI F., FERRARI S., CARAMELLI M., MONACO S., CAPUCCI L. & ZANUSSO G. (2008). Intraspecies transmission of BASE induces clinical dullness and amyotrophic changes. *PLoS Pathogens*, **4**, e1000075.

MONLEON E., MONZON 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**, 15–18.

MURAYAMA Y., YOSHIOKA M., MASUJIN K., OKADA H., IWAMARU Y., IMAMURA M., MATSUURA Y., FUKUDA S., ONOE S., YOKOYAMA T. & MOHRI S. (2010). Sulfated dextrans enhance *in vitro* amplification of bovine spongiform encephalopathy PrP(Sc) and enable ultrasensitive detection of bovine PrP(Sc). *PLoS One*, **5**, e13152.

OKADA H., IWAMARU Y., IMAMURA M., MASUJIN K., MATSUURA Y., SHIMIZU Y., KASAI K., MOHRI S., YOKOYAMA T. & CZUB S. (2011). Experimental H-type bovine spongiform encephalopathy characterized by plaques and glial- and stellate-type prion protein deposits. *Vet. Res.*, **42**, 79. doi:10.1186/1297-9716-42-79

ORRU C.D., BONGIANNI M., TONOLI G., FERRARI S., HUGHSON A.G., GROVEMAN B.R., FIORINI M., POCCHIARI M., MONACO S., CAUGHEY B. & ZANUSSO G. (2014). A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings. *N. Engl. J. Med.*, **371**, 519–529.

ORRU C.D., WILHAM J.M., VASCELLARI S., HUGHSON A.G. & CAUGHEY B. (2012). New generation QuIC assays for prion seeding activity. *Prion*, **6**, 147–152. doi: 10.4161/pri.19430.

PRINCE M.J., BAILEY J.A., BARROWMAN P.R., BISHOP K.J., CAMPBELL G.R. & WOOD J.M. (2003). Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **22**, 37–60 (English); 61–82 (French); 83–102 (Spanish).

SCHALLER O., FATZER R., STACK M., CLARK J., COOLEY W., BIFFIGER K., EGLI S., DOHERR M., VANDELVELDE M., HEIM D., OESCH B. & MOSER M. (1999). Validation of a Western immunoblotting procedure for bovine PrP^{Sc} detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl.)*, **98**, 437–443.

STACK M.J. (2004). Western immunoblotting techniques for the study of transmissible spongiform encephalopathies *In: Techniques in Prion Research*, Lehmann S. & Grassi J., eds. Birkhauser, Basel, Switzerland. ISBN 3-7643-2415-5

SIMMONS M.M., HARRIS P., JEFFREY M., MEEK S.C., BLAMIRE I.W.H. & WELLS G.A.H. (1996). BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet. Rec.*, **138**, 175–177.

WELLS G.A.H. & WILESMITH J.W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.*, **5**, 91–103.

WILESMITH J.W., HOINVILLE L.J., RYAN J.B.M. & SAYERS A.R. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: aspects of the clinical picture and analyses of possible changes 1986–1990. *Vet. Rec.*, **130**, 197–201.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la encefalopatía espongiforme bovina
(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico y los reactivos para la encefalopatía espongiforme bovina

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.