

ESTUDIO DE TRANSMISIBILIDAD DEL SCRAPIE ATÍPICO Y LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA OVINA EN LA ESPECIE PORCINA

Hedman, C.¹, Marín, B.¹, Corbière, F.⁴, Filali, H.¹, Vázquez, F.², Romero, A.²,
Hernandez, R.¹, Pitarch, J.L.¹, Girón, W.¹, Sarasa, R.¹, Garza, M.C.¹, Vidal, E.³,
Pumarola, M.³, Bolea, R.¹, Andreoletti, O.⁴, Badiola, J.J.¹

¹Centro de Inv. en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Fac. de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013. hedman@unizar.es

²Priocat, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA.

³Fac. de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, 08193 Bellaterra

⁴UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hotes Agents Pathogenes, Ecole Nationale Veterinaire de Toulouse, France.

INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, de curso lento e irreversible con desenlace fatal. Se conocen distintas enfermedades de este tipo que afectan a la especie humana, a muchos mamíferos de interés agropecuario como ovejas, cabras y vacas, y a otros domésticos como los gatos o salvajes como ciervos, visones y alces. Estas enfermedades son producidas por la forma patológica de una proteína denominada "prión" y pueden ser transmitidas de unas especies a otras, a través del consumo de productos o subproductos de animales infectados. No existe conocimiento sobre la ocurrencia natural de EET en cerdos. Las primeras investigaciones sobre enfermedades priónicas en la especie porcina describen un intento fallido de transmitir el Kurú a cerdos que permanecieron bajo observación por un periodo de 52 a 76 meses (Gibbs *et al.*, 1979). Con el comienzo del programa de control de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) en el Reino Unido, se cree que varias especies domésticas fueron expuestas al consumo de harinas de carne y hueso de ruminantes. Posteriormente se llevaron a cabo estudios para determinar la transmisibilidad del agente causal de la EEB a la especie porcina a través de vías parenterales de inoculación y de la alimentación. Finalmente se consiguió la transmisión de la enfermedad tras la inoculación simultánea por las vías intracerebral, intravenosa e intraperitoneal, habiendo recibido cada cerdo una dosis de un gramo de homogeneizado de encéfalo de vacas afectadas con EEB (Dawson *et al.*, 1990). Sin embargo, no se ha demostrado la transmisión oral de la EEB en cerdos (Dawson *et al.*, 1990; Wells *et al.*, 2003). La posible propagación del agente de la EEB en otras especies que forman parte de la cadena alimentaria humana como son las ovejas, cabras y cerdos, debe ser considerada por representar un riesgo potencial para la infección por priones en humanos. Por otro lado, el uso de cerdos como donantes de tejidos para injertos podría causar preocupación, dada la descripción de la variante de Creutzfeldt Jacob (vCJD) en un paciente humano receptor de dura madre porcina (Heath *et al.*, 2006). El objetivo de este trabajo es evaluar por primera vez la transmisión de 3 cepas de priones en los cerdos y determinar su susceptibilidad clínica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos se desarrollaron bajo la licencia P113/10 del proyecto COTSA, aprobada por el comité ético de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de animales se realizaron de acuerdo con la Política Española de Protección de los Animales RD1201/05, que cumple con la Directiva de la Unión Europea 86/609 relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación. Para este estudio, 21 cerdos con edades de 7 a 9 meses fueron divididos en tres lotes de siete animales cada uno. Los lotes 1 y 2 fueron inoculados con dos diferentes cepas de scrapie atípico; mientras que el grupo 3 fue inoculado con el agente de la EEB obtenido de ovejas experimentalmente infectadas (EEBov). La inoculación se realizó por vía intracerebral, depositando 0,5ml de homogeneizado al 10% de encéfalo de animales positivos en solución salina. Los animales fueron

observados y evaluados periódicamente. Los signos clínicos propios de una EET se asociaron con la presentación de cambios comportamentales y anomalías en la marcha o con una reacción exagerada a estímulos (respuesta a la amenaza o la prueba del cuello), como descrito en experimentos similares (Konold *et al.*, 2006, Wells *et al.*, 2003, Wells *et al.*, 2006). Los sacrificios de los animales estudiados se realizaron con una sobredosis intravenosa de pentobarbital, cuando los cerdos se encontraban en un estado clínico terminal. A la necropsia, muestras del sistema nervioso central (SNC), tracto digestivo, aparato respiratorio y otros órganos, fueron tomadas por duplicado, una de ellas destinada a la solución de formol al 10% y la otra a congelación a -80°C. Las muestras fijadas en formol fueron procesadas en bloques de parafina. Las preparaciones histológicas de 4µm fueron teñidas con Hematoxilina Eosina para su posterior evaluación histopatológica. Las lesiones fueron valoradas según intensidad de 0 a 5. La identificación de la PrP^{sc} se hizo mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo 2G11 en secciones del encéfalo. A su vez, se realizó la técnica de Western Blotting (WB) para estudiar el patrón de glicosilación de la PrP^{sc} en el scrapie atípico (TeSeE WESTERN BLOT-355-1169) y en EEB (Prionics®-Check WESTERN BSE).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La siguiente presentación comprende resultados parciales para evaluar el potencial de transmisión del scrapie atípico y del agente de la EEB pasado en ovejas por la vía intracerebral. Ningún cerdo de los grupos 1 y 2, inoculados con las cepas de scrapie atípico, ha presentado signos neurológicos clínicos compatibles con una EET, 34 meses post inoculación (mpi). Sin embargo, en ratones transgénicos que expresan PrP^c porcina se ha conseguido transmitir la infección con el agente del scrapie atípico, aunque en un bajo porcentaje (Espinosa *et al.*, 2009). En contraste, en el grupo 3, inoculado con EEBov, los signos clínicos fueron evidentes ya a los 19 mpi en un cerdo (P_1224). Los periodos de incubación variaron entre 19 y 27 mpi, utilizando sólo una vía de inoculación (Konold *et al.*, 2009; Ryder *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2003), en contraste con estudios en los que utilizaron la vía intracerebral, intravenosa e intraperitoneal y un mayor volumen de homogeneizado para reproducir la enfermedad (Dawson *et al.*, 1990). Los signos clínicos fueron similares en todos los cerdos afectados, presentando al inicio cambios de comportamiento, nerviosismo, confusión y depresión. Estos cambios de comportamiento se acompañaban al inicio de una leve ataxia de miembros posteriores, progresando en un desorden generalizado en la locomoción hasta, finalmente, alcanzar un decúbito persistente y dificultades para ponerse en pie, signos compatibles con la EEB en bovinos (Braun *et al.*, 1998; Konold *et al.*, 2009) y porcinos (Konold *et al.*, 2009). Un cerdo de cada grupo (1,2 y 3) fue sacrificado durante el periodo preclínico. A pesar del avanzado periodo de incubación en los cerdos del grupo uno y dos (21 y 28 mpi) no se observó ningún cambio histopatológico. En los estudios inmunohistoquímicos, el cerdo P_1226 del grupo 1 presentó un leve a moderado marcaje de la PrP^{sc}, con un evidente patrón lineal en corteza cerebral e hipocampo. En P_1217 del grupo 2 y el P_1219 del grupo 3 resultaron negativos a esta técnica (8mpi). Los 3 cerdos preclínicos fueron negativos a la detección del prión por WB. No se ha observado algún cambio clínico/de comportamiento en los restantes cerdos de los grupos 1 y 2. Lesiones vacuolares severas fueron observadas en diferentes regiones del encéfalo de los 6 animales clínicamente afectados del grupo 3. En 5 de ellos la corteza cerebral presentó espongiosis y vacuolización severa. Las lesiones se localizaron principalmente en las capas más profundas de la sustancia gris en corteza frontal y reduciendo gradualmente en occipital. El cerdo P_1221 mostró una moderada vacuolización en corteza cerebral, pero una severa espongiosis y vacuolización en núcleos basales. El núcleo caudado presentó un gran cambio esponjiforme mientras que el núcleo septal fue moderado en los 6 cerdos afectados. Todos los animales presentaron lesiones importantes en el tálamo, y un cambio moderado en hipotálamo. En cerebelo, la capa granular y molecular mostraron lesiones vacuolares intensas. En contraste, las lesiones halladas en medula oblongada fueron más moderadas. En todos los tejidos

del encéfalo de los animales clínicos, el inmunomarcaje (detección de PrP^{sc}) resultó positivo, con mayor intensidad en sustancia gris de corteza cerebral, coincidiendo con las lesiones localizadas entre las capas IV y VI. Los perfiles de depósito de PrP^{sc} predominantes fueron el punteado fino, seguido del perivacuolar, perineuronal y en menor medida agregados amorfos. Otras regiones con un alto grado de depósito de PrP^{sc} fueron los núcleos basales, tálamo e hipotálamo, el hipocampo, que presentó un moderado inmunomarcaje a pesar de no mostrar intensas lesiones vacuolares. Asimismo, el cerebelo de todos los animales presentó una gran reacción a la presencia de PrP^{sc}. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en la EEB, la médula oblongada presentó menos cantidad de depósito de PrP^{sc} y de espongiosis. El WB reveló un patrón de 3 bandas con una predominante banda monoclogosilada en los cerdos clínicamente positivos. En los animales preclínicos se obtuvieron resultados negativos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● Braun, U., Pusterla, N., Schicker, E., 1998. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 20, S270-+. ● Dawson, M., Wells, G.A.H., Parker, B.N.J., Scott, A.C., 1990. Veterinary Record 127, 338-338. ● Espinosa, J.C., Herva, M.E., Andreoletti, O., Padilla, D., Lacroux, C., Cassard, H., Lantier, I., Castilla, J., Torres, J.M., 2009. Emerging Infectious Diseases 15, 1214-1221. ● Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C., Amyx, H. 1979. Vol 2, S. B. Prusiner & W. J. Hadlow Edition. Academic Press, New York. ● Heath, C.A., Barker, R.A., Esmonde, T.F., Harvey, P., Roberts, R., Trend, P., Head, M.W., Smith, C., Bell, J.E., Ironside, J.W., Will, R.G., Knight, R.S. 2006. J Neurol Neurosurg Psychiatry 77, 880-882. ● Konold, T., Spiropoulos, J., Chaplin, M.J., Thorne, L., Spencer, Y.I., Wells, G.A., Hawkins, S.A. 2009. BMC Vet Res 5, 35. ● Ryder, S.J., Hawkins, S.A., Dawson, M., Wells, G.A. 2000. J Comp Pathol 122, 131-143. ● Wells, G.A., Hawkins, S.A., Austin, A.R., Ryder, S.J., Done, S.H., Green, R.B., Dexter, I., Dawson, M., Kimberlin, R.H. 2003. J Gen Virol 84, 1021-1031.

TRANSMISION STUDY OF ATYPICAL SCRAPIE AND SHEEP-BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY TO SWINE: PRELIMINARY FINDINGS

ABSTRACT: The susceptibility of other species to transmissible spongiform encephalopathies (TSE) grows when some sectors of the European Union raises the possibility of lifting the ban on feeding pigs and poultry with animal meal. Moreover, the use of pigs as graft donor could cause concern, given a report of Creutzfeldt-jacob variant (vCJD) in the recipient of a porcine dura mater graft. Bovine spongiform encephalopathy (BSE) can be experimentally produced in swine by inoculating infected material by several routes simultaneously 3 groups of 7 pigs, were inoculated with 2 atypical scrapie strains and the agent of BSE passaged in sheep (BSEs). Animals were under clinical observation. Western blot, histopathology and immunohistochemistry was performed to confirm the diagnosis. Clinical signs compatible with TSE, vacuolar changes and several pattern of immunopositivity were identified in different regions of the brain from affected pigs. Different neuropathology was observed between pigs infected by the atypical scrapie and BSEs agent. This study confirms that the susceptibility of pigs to TSE and the high pathogenicity of the BSEs agent demonstrated in mice model. The aim of the work will be the determination of the pig neuropathology associated to this kind of prion infection.

Keywords: TSE/SHEEP/SWINE