

## ESTUDIO DE LA INFECTIVIDAD DE TEJIDOS Y FLUIDOS DE CAPRINOS RESISTENTES, INOCULADOS INTRACEREBRALMENTE CON ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA DE ORIGEN CAPRINO Y BOVINO

Sola, D<sup>1</sup>, Raksa HC<sup>1</sup>, Pitarch JL<sup>1</sup>, Langeveld J<sup>2</sup>, Bossers A<sup>2</sup>, Marín B<sup>1</sup>, Barillet F<sup>3</sup>, Bouvier F<sup>3</sup>, Monleón E<sup>1</sup>, Bolea R<sup>1</sup>, Andreoletti O<sup>4</sup>, Badiola JJ<sup>1</sup>, Acín C<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes, Facultad de Veterinaria, C/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza, España.

<sup>2</sup>Central Veterinary Institute of Wageningen UR; Netherlands.

<sup>3</sup>INRA-UR 631 SAGA Castanet-Tolosan, France and UE 332, Bourges, France. 4INRA, UMR 1225 IHAP; ENV Toulouse, France.

### INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles afectan tanto a la especie humana como a los animales, y se caracterizan por un largo periodo de incubación y lesiones neurodegenerativas que conducen a la muerte del individuo. En total, se han descrito dieciséis enfermedades diferentes incluidas en el grupo de las Encefalopatías espongiformes transmisibles (EET): nueve que afectan a los seres humanos y siete a los animales, todos ellos mamíferos. En el caso de las enfermedades animales, las EET más importantes son el scrapie en ovinos y caprinos, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en el ganado bovino y la enfermedad crónica caquectizante (ECC) en ciervos.

La detección de los primeros casos de la EEB en el Reino Unido (Wells *et al.*, 1987) y posteriormente en el resto de la UE, así como la asociación de esta enfermedad con la vECJ (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997) ha dado lugar a que, durante los últimos años, se hayan adoptado numerosas medidas legislativas dirigidas a erradicar la EEB y evitar su transmisión a otras especies animales y al hombre. En el caso del scrapie, no hay evidencias de que suponga un riesgo para la salud humana (Detwiler y Baylis, 2003). Sin embargo, se ha demostrado que la especie caprina también puede verse afectada por la EEB de forma natural (Eloit *et al.*, 2005), y también la transmisión experimental por vía oral del agente de la EEB al ovino y caprino (Foster *et al.*, 1993) lo que pone de manifiesto nuestro principal objetivo, la importancia y la necesidad de nuevos estudios para determinar y valorar el riesgo para la salud pública que suponen los productos de origen caprino afectados de EEB.

La distribución en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema linforreticular (SLR) del agente de la EEB en la oveja (Foster *et al.*, 1996), junto con la dificultad de distinguir clínica o anatomopatológicamente entre el scrapie y la EEB en esta especie (EFSA, 2000), constituye un riesgo adicional de la introducción del agente causal de la EEB en la cadena alimentaria. En cuanto a la distribución periférica del agente de la EEB en el ganado caprino, no está todavía estudiada, sin embargo sí se ha conseguido encontrar infectividad en el músculo psoas mayor tras bioensayo en ratones (Aguilar-Calvo *et al.*, 2015).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado ratones de la línea transgénica humana Tg340, que expresan 4 veces la PrP<sup>C</sup> humana y son metionina para el codón 129. Se han inoculado 6 animales por jaula y una jaula por inóculo.

Para los inóculos se utilizaron muestras de tejidos de cabras infectadas con EEB bovina y con EEB caprina. Además, cada cabra portaba un genotipo en el codón 222: un animal homocigoto Glutamina/Glutamina (Q222Q), un heterocigoto Glutamina/Lisina (Q222K) y un homocigoto Lisina/Lisina (K222K) inoculados con EEB caprina de segundo pase en cabra; y un animal homocigoto Glutamina/Glutamina y un Lisina/Lisina inoculados con EEB bovina. Los tejidos elegidos inicialmente fueron óbex, músculo semitendinoso y músculo tríceps braquial, para posteriormente continuar con hígado y fluidos tales como sangre entera, células blancas, suero de leche y células de la leche.

Para la elaboración de los inóculos se utilizaron muestras de los distintos tejidos almacenadas a -80°C. De cada muestra se utilizaron 0,5 mg de tejido que se

homogeneizaron en 5 ml de suero fisiológico. El homogenizado se filtró mediante una gasa estéril y se añadieron 2,5 µl de antibiótico. Los inóculos se sembraron en placas de Petri agar sangre y se incubaron a 37 °C durante 48 horas, para comprobar su esterilidad.

Los animales se anestesiaron con isoflurano y se inocularon intracerebralmente con 20 µl de homogenizado y después se administró a cada ratón una dosis de analgésico (0,3 mg por kg de buprenorfina diluida en suero fisiológico). Si los signos clínicos no son evidentes, los ratones son sacrificados en torno a los 800 días post-inoculación.

Para valorar la infectividad de los tejidos inoculados en ratones se procedió a la realización de técnicas inmunohistoquímicas y de glicosilación.

Este estudio se realizó de acuerdo con la política de Protección Animal española comprendida en el Real Decreto 53/2013, que cumple con la directiva europea 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos y experimentales. El protocolo experimental se ha aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza, permiso PI16/16.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron la presencia de síntomas como delgadez, ataxia o lordosis en los ratones inoculados con encéfalo de cabra en torno a los 750 días post-inoculación. Padilla *et al.*, (2011) al inocular líneas de ratones humanas, entre ellas la línea tg340, con diferentes cepas de EEB (bovina, ovina, caprina), observaron clínica en los ratones inoculados con encéfalo de cabra afectada de EEB en torno a los 700 días post-inoculación. Hay que tener en cuenta que nuestros ratones fueron inoculados con muestras de músculo que contenían bajas cantidades del prión e incluso muestras que se consideraron negativas mediante las técnicas convencionales de diagnóstico. La detección de PrP<sup>Sc</sup> en las muestras recogidas de los ratones inoculados supondría un resultado de gran impacto a nivel internacional ya que implicaría un control más exhaustivo en la cadena alimentaria de los productos de origen caprino como la leche, la carne y sus subproductos. Mediante la técnica de inmunohistoquímica se observó la presencia de acúmulos de PrP<sup>Sc</sup> con diferentes patrones y mediante la técnica de Western Blot se valoraron el perfil de glicosilación de las muestras obtenidas observándose patrones de glicosilación compatibles con la EEB.

España tiene la segunda población de caprino más importante de la Unión Europea, y es la tercera más grande en producción de leche, de ahí que sea de gran interés el control y erradicación de enfermedades como las EETs cuya repercusión económica (sacrificios selectivos o completos, indemnizaciones) resulta considerable en los presupuestos destinados a la sanidad animal. Los planes de vigilancia y erradicación del scrapie ovino se basan en la estrategia de sacrificio selectivo o completo de los rebaños afectados y la selección genética de los animales resistentes; sin embargo, en la especie caprina no existe este sistema de selección genética que sería fundamental en la aplicación de planes de prevención y erradicación. Con los resultados obtenidos se pretende contribuir a la generación de conocimiento, promoviendo su difusión y explotación por el conjunto de la sociedad. El impacto científico potencial que se pretende se basa en:

- a) Impacto estratégico: definición del riesgo de la exposición del hombre a productos caprinos contaminados con EEB (leche y carne y sus subproductos).
- b) Multidisciplinaridad. Mediante estudios de bioensayo, genética, biología molecular, bioquímica y patología.
- c) Impacto social y económico. En función de los resultados obtenidos la consecuencia inmediata a nivel nacional e internacional es una redefinición de los materiales específicos de riesgo en los mataderos de pequeños rumiantes. Los resultados obtenidos serían perfectamente transferibles a la empresa, que podría, generar kits de diagnóstico rápido para detectar la enfermedad en los nuevos materiales específicos de riesgo, y también kits rápidos de genotipado para detectar a los animales resistentes serían utilizados como futuros reproductores.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Calvo, P., Fast, C., Tauscher, K., Espinosa, J. C., Groschup, M. H., Nadeem, M., Goldmann, w., Langeveld, J., Bossers, A., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2015). Effect of

Q211 and K222 PRNP polymorphic variants in the susceptibility of goats to oral infection with goat bovine spongiform encephalopathy. *J. Infect. Dis.*, 212(4), 664-672.

- Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent, *Nat.* (1997) 389(6650):498-501.
- Detwiler LA, Baylis M. The epidemiology of scrapie, *Rev Sci Tech.* (2003) 22(1):121-43.
- EFSA, Opinion of the SSC oral exposure of humans to the BSE agent: infective dose and species barrier. Adopted by the scientific steering committee at its meeting of 13-14 April 2000.
- Eloit M, Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P. BSE agent signatures in a goat, *Vet. Rec.* (2005) 156:523-524.
- Foster JD, Hope J, Fraser H. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats, *Vet Rec.* (1993) 133(14): 339-341.
- Foster JD, Wilson M, Hunter N. Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie, *Vet Rec.* (1996) 139(21):512-515.
- Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P. The same prion strain causes vCJD and BSE, *Nat.* (1997) 389(6650):448-450.
- Padilla, D., Béringue, V., Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutiérrez, A., Pintado, B., Laude, H., & Torres, J. M. (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS pathogens*, 7(3), e1001319.
- Wells GAH, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle, *Vet. Rec.* (1987) 121: 419-420.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por los proyectos goatBSE (FOOD-CT-2006-36353); AGL2012-40071 y Central Veterinary Institute of Wageningen UR (CVI). Los autores quieren agradecer la asistencia prestada por el personal técnico, investigadores y estudiantes de doctorado del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

#### **STUDY OF THE INFECTION OF TISSUES AND FLUIDS OF RESISTANT GOATS, INTRACEREBRAL INOCULATION WITH SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY BOVINE OF CAPRINE AND BOVINE ORIGIN**

**ABSTRACT:** Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) are characterized by a long incubation period and neurodegenerative lesions that lead to the death of the individual. TSEs became more important after the association of BSE, in 1996, with the appearance of a variant of Creutzfeldt - Jakob disease (vCJD) in humans. This supposed a great crisis in Europe and, since that moment, the investigation in this area has been improving and trying to clarify the possible origin of the disease. Although, it has been shown that the goat species could also be affected by BSE in a natural way, which shows the importance of new studies to determine the risk to public health posed by products of goat infected with BSE. In this study the technique of bioassay in human transgenic mouse has been performed to assess the risk that supposed to food safety tissues of goat origin infected with BSE.

**Keywords:** Prion, BSE, goat, mice.