

DETECCIÓN DE ANIMALES AFECTADOS DE SCRAPIE EN FOCOS DE ERRADICACIÓN MEDIANTE BIOPSIAS DE TEJIDO LINFOIDE

Monleón, E., Acín, C., Bolea, R., Monzón, M., Galindo, I., Vargas, M.A., Badiola, J.J. Unidad de Histología y Anatomía Patológica. Universidad de Zaragoza. C/ Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza. emonleon@unizar.es

INTRODUCCIÓN

El scrapie es una enfermedad neurodegenerativa, incluida en el grupo de las encefalopatías espongiiformes transmisibles, que afecta al ganado ovino y caprino. Esta enfermedad es endémica en diversas regiones europeas (Hagenaars *et al.*, 2001) y de EEUU (O'Rourke *et al.*, 2002). El control y erradicación del scrapie se ha visto obstaculizado en gran medida por la ausencia de tests de diagnóstico prácticos, sensibles y que se puedan realizar *in vivo*. Actualmente el diagnóstico del scrapie se basa en la observación de las lesiones mediante microscopía óptica o en la detección de la proteína PrPsc en muestras del sistema nervioso central (SNC) obtenidas *post mortem* (Organización Internacional de Epizootias, 2005)

Los estudios realizados sobre la patogenia de la enfermedad muestran que la proteína patológica PrPsc se puede detectar en el tejido linfoide de animales afectados de scrapie incluso antes de que se desarrollen los síntomas clínicos de la enfermedad y de que la PrPsc alcance el SNC. En la mayoría de los animales con genotipos susceptibles la PrPsc se puede detectar inicialmente en la placa de Peyer ileal y en los ganglios linfáticos mesentéricos y, posteriormente, en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal y en otros tejidos del sistema linforreticular (van Keulen *et al.*, 2002). En algunos trabajos se han propuesto tests de diagnóstico *in vivo* basados en la detección de la PrPsc en tejido linfoide obtenido mediante biopsia de tonsilas (Schreuder *et al.*, 1998), tercer párpado (O'Rourke *et al.*, 2000) o mucosa rectal (González *et al.*, 2005).

El objetivo de este trabajo es valorar y comparar en condiciones de campo las técnicas de diagnóstico *in vivo* basadas en la detección de PrPsc en biopsias de tejido linfoide de tercer párpado y de mucosa rectal.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente estudio se han incluido un total de 268 ovinos y 42 caprinos procedentes de dos rebaños diferentes. Del primero, un rebaño monitorizado compuesto por individuos procedentes de diferentes focos de erradicación de scrapie, se analizaron 201 animales (167 ovinos y 34 caprinos). Del segundo, un foco de erradicación detectado en el programa de vigilancia del scrapie, se estudiaron 109 animales (con haplotipos VRQ y ARQ) seleccionados aleatoriamente.

De cada animal se obtuvo una biopsia de mucosa rectal (Espanes *et al.*, 2006) y una biopsia de tercer párpado (O'Rourke *et al.*, 2002) las muestras se fijaron en formol al 10% y se procesaron para el examen histológico e inmunohistoquímico. Mediante microscopía óptica se determinó el número de folículos linfoides obtenidos en la biopsia y el número de folículos linfoides inmunoteñidos en cada muestra positiva. Durante los seis meses posteriores a la realización de las biopsias, se sacrificaron o murieron 75 animales (63 ovejas y 12 cabras) de los incluidos en el estudio; de estos animales se tomaron muestras del SNC y del sistema linforreticular (SLR) para la confirmación de la enfermedad mediante las técnicas reconocidas por la Organización Internacional de Epizootias (examen histológico e inmunohistoquímico del SNC).

Para el examen inmunohistoquímico se realizaron los siguientes pretratamientos: inmersión en ácido fórmico al 98%, tratamiento con proteinasa K (Roche, Suiza; 4 µg/ml) y autoclavado hidratado. En la inmunotinción se utilizó el anticuerpo L42 (R-Biopharm, Alemania; dilución 1:500; incubación 30 minutos a temperatura ambiente), el sistema de visualización Envision (DAKO, Dinamarca) y el cromógeno diaminobencidina.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se detectó la proteína PrPsc en el tejido linfóide obtenido mediante biopsias de tercer párpado y/o mucosa rectal procedente de 2 caprinos y 39 ovinos, 14 de los cuales pertenecían al foco de erradicación. El número de muestras positivas fue mayor cuando se utilizó la biopsia de tercer párpado (Tabla 1), debido a que mediante esta técnica se obtuvo un menor número de muestras inadecuadas (ausencia de folículos linfoides; $p < 0,001$). La media de folículos linfoides por muestra obtenidos mediante biopsia de tercer párpado fue de 8,7, y de 8,4 en el caso de la biopsia de recto. El porcentaje de folículos linfoides positivos en las muestras varió entre un 8 (1 folículo positivo de 12 obtenidos en la biopsia) y un 100%. En 3 casos, se pudo diagnosticar la enfermedad con un único folículo linfóide en la muestra.

Tabla 1. Comparación de los resultados de la detección de PrPsc en tejido linfóide obtenido mediante biopsia de tercer párpado y de mucosa rectal.

BIOPSIA DE LA MUCOSA RECTAL	BIOPSIA DE TERCER PÁRPADO				TOTAL
	Positiva	Negativa	Inadecuada		
Positiva	25	5	1		31
Negativa	4	206	12		222
Inadecuada	6	37	15		58
TOTAL	35	248	28		311

La especificidad de la técnica de diagnóstico del scrapie mediante la detección de la PrPsc utilizando tejido obtenido por biopsia, tanto de tercer párpado como de mucosa rectal, fue de un 100% respecto a las técnicas de confirmación *post mortem* reconocidas por la OIE. Sin embargo, la sensibilidad de la técnica fue menor, siendo del 72% cuando se utilizó la biopsia de tercer párpado y del 65% cuando se analizó la muestra obtenida mediante biopsia rectal. Los falsos negativos se pueden deber a diferentes causas, como la ausencia o poca presencia de la PrPsc en el SLR de algunos animales infectados, la distribución no homogénea de la proteína patológica en el SLR o al tamaño inadecuado de la muestra (con escasos folículos linfoides). En 2 de los animales estudiados mediante las técnicas de confirmación *post mortem*, sólo se detectó PrPsc en el SNC (no en el SLR). Por otro lado, mediante la técnica de diagnóstico *in vivo* se detectó un caso preclínico en el que la PrPsc todavía no había alcanzado el sistema nervioso central (Tabla 2).

Tabla 2. Detección de PrPsc en tejido linfóide obtenido mediante biopsia y en muestras del sistema nervioso central (SNC) y sistema linforreticular (SLR) obtenidas *post mortem*.

BIOPSIA	SNC	SLR	Nº ANIMALES
+	+	+	18
-	-	-	45
-	+	+	5
-	+	-	2
+	-	+	1
Inadecuada	+	+	1
Inadecuada	-	-	3

Los resultados de este estudio de campo muestran que tanto las muestras obtenidas mediante biopsia de tercer párpado como de mucosa rectal son adecuadas para el diagnóstico *in vivo* del scrapie. Las muestras obtenidas mediante biopsia de tercer párpado dieron mejores resultados, sin embargo su toma presenta una mayor dificultad ya que provoca más estrés al animal por lo que dificulta la inmovilización del animal y se invierte más tiempo en su realización.

El programa de control de scrapie se basa principalmente en la detección de los animales infectados mediante el análisis *post mortem* de los animales sospechosos y de una muestra aleatoria de la población, la consiguiente eliminación de los rebaños afectados o de los animales con genotipos susceptibles de los mismos y en un programa de selección genética, que consiste en el incremento de la frecuencia del haplotipo ARR y la disminución

o eliminación del VRQ. Tras más de 4 años de aplicación de este programa, se han detectado algunos problemas. Así, por ejemplo, se han diagnosticado animales que presentan el genotipo ARR/ARR. Por otro lado, no se disponen de animales con garantías para repoblar los rebaños objetos de sacrificio. El diagnóstico del scrapie utilizando biopsias puede suponer una importante herramienta en el control y erradicación del scrapie, aunque debido a que la sensibilidad de la técnica no es del 100%, no puede utilizarse exclusivamente. La actuación directa en rebaños infectados o de riesgo y en zonas con elevada incidencia utilizando conjuntamente la técnica de diagnóstico *in vivo* del scrapie mediante biopsias y el programa de selección genética podría reducir el elevado coste económico y social que el programa de control de la enfermedad supone en la actualidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Espanes, A., Press McL.C., Landsverk, T., Tranulis, M.A., Aleksandersen, M., Gunnes, G., Benestad, S.L., Fuglesteit, R., Ulvund, M.J. 2006. Deterction of PrPSc in rectal biopsy and necropsy simples from sheep with experimental scrapie. Journal of Comparative Pathology, 134: 115-125.
- Gonzalez, L., Jeffrey, M., Siso, S., Martin, S., Bellworthy, S.J., Snack, M.J., Chaplin, M.J., Davis, L., Dagleish, M.P., Reid, H.W. 2005. Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. Veterinary Record, 156(26):846-7.
- Hagenaars, T.J., Ferguson, N.M., Donnelly. C.A., Anderson, R.M. 2001. Persistence patterns of scrapie in a sheep flock. Epidemiology and Infection, 127: 157-167.
- Organización Internacional de Epizootias. 2004. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 5ª Edición.
- O'Rourke, K.I., Baszler, T.V., Besser, T.E., Miller, J.M., Cutlip, R.C., Wells, G.A.H., Ryder, S.J., Parish, S.M., Hamir, A.N., Cockett, N.E., Jenny, A., Knowles, D.P. 2000. Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. Journal of Clinical Microbiology, 38:3254-3259.
- O'Rourke, K.I., Duncan, J.V., Logan, J.R., Anderson, A.K., Norden, D.K., Williams, E.S., Combs, B.A., Stobart, R.H., Moss, G.E., Sutton, D.L. 2002. Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. Clinical Diagnostic Laboratory Immunology, 2002;9(5):966-71.
- 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. Veterinary Record, 142(21):564-8.
- 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.