

IIP 1/01

incidencia de la encefalopatía
espongiforme
bovina
en Castilla y León

Fecha de aprobación:

Pleno ordinario 27-09-01

I antecedentes

El Consejo Económico y Social, haciéndose eco de la actualidad del tema y teniendo en cuenta la repercusión económica y social que la Encefalopatía Espongiforme Bovina (en adelante EEB) está teniendo, decidió, en la Sesión Plenaria del día 25 de enero de 2001, con apoyo en la competencia del Consejo recogida en la letra c) del artículo 3º.1 de la Ley 13/1990, de su Creación, la realización de un Informe a Iniciativa Propia para conocer la incidencia de la EEB en Castilla y León.

Teniendo en cuenta que el tema objeto de estudio presenta aspectos económicos, junto con otros sanitarios y sociales, y que también, como consecuencia de alguna de las medidas adoptadas, se han derivado consecuencias medioambientales, se decidió encomendar su análisis y elaboración a una Comisión de Trabajo Específica, cuya creación fue aprobada por el Pleno del Consejo en su sesión de día 29 de marzo de 2001. Esta solución permitía también integrar, en la citada Comisión, a las tres Organizaciones Agrarias y a los Consumidores de Castilla y León, como representantes de los sectores más directamente afectados.

Al objeto de disponer de un apoyo técnico útil para el análisis encomendado a la Comisión de Trabajo Específica, y teniendo en cuenta la especialización de los contenidos, se acordó por la Comisión Permanente en su reunión de 19 de abril de 2001, encargar, a conocidos expertos en la materia, la realización de unos trabajos sobre los aspectos sanitarios, medioambientales y económicos del problema en relación con Castilla y León, trabajos que se adjuntan como Anexo.

Estos trabajos fueron presentados en el CES ante la Comisión de Trabajo Específica, por sus autores, que analizaron las características de esta enfermedad emergente y su conexión con la ingesta de carnes de bóvidos infectados por la EEB, su consideración de enfermedad priónica, lo que representa un mecanismo patogénico completamente nuevo, las tareas de investigación que se están llevando a cabo, sus especiales características de comportamiento en la barrera de especie. Se estudian también las consecuencias económicas que esta crisis está teniendo, tanto para el Sector Público como para el Sector Privado. Y se analiza el tratamiento de las harinas cárnicas para su eliminación o para posibles aprovechamientos energéticos.

Es de destacar que, en Castilla y León, los casos de EEB, en el momento de la elaboración de estos trabajos, se limitaban a once, representando un 0,001% sobre la cabaña bovina regional, cifra que para España se sitúa en un 0,002 (62 casos de EEB), no teniéndose constancia de ningún caso de transmisión a seres humanos.

En el desarrollo de las tareas preparatorias y de elaboración del informe, se contó con la comparecencia en el CES del Excmo. Sr. Consejero de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León, D. José Valín Alonso, en el Pleno del día 22 de febrero de 2001, quién informó sobre la situación en la Comunidad producida por la Encefalopatía Espongiforme Bovina, inmediatamente después de haberlo hecho en el Parlamento Regional, exponiendo la situación general de la EEB en Castilla y León, cómo está afectando en diferentes aspectos: salud humana, sector ganadero, consumo y eliminación de desechos, y enumerando las actuaciones que desde la Consejería se están llevando a cabo para corregir o paliar la situación creada.

También contó la Comisión de Trabajo Específica con la presencia del Ilmo. Sr. Director General de Producción Agropecuaria, D. Juan José Lozano Barriuso, lo que sirvió para conocer las actuaciones de su Dirección General al respecto.

A solicitud del CES se remitió por la Consejería de Agricultura y Ganadería el *“Informe de las actuaciones realizadas hasta el 31 de marzo de 2001 por la Consejería de Agricultura y Ganadería en el marco del Programa Coordinado de Control y Vigilancia de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles”*.

Este documento, con apoyo en las normas que resultan de aplicación, da cuenta de las diversas actuaciones que desde la Consejería se han ido impulsando en materia de investigación y diagnóstico de las EEB, tales como actuaciones estructurales, de investigación, y de formación profesional y capacitación en la ejecución de la técnica de diagnóstico rápido; en cuanto a materia de control de especies y productos de la alimentación animal, como control de movimientos de bovinos, ovinos y caprinos, control de residuos MER, control de piensos, y control de nacimientos y sacrificios de animales; pago de indemnizaciones de animales sacrificados; gestión de retirada de cadáveres de animales muertos en las explotaciones; destrucción de proteínas animales con destino a la alimentación animal; campañas informativas; etiquetado de carne de vacuno; compras públicas en régimen de intervención; y ayudas a las explotaciones extensivas.

II conclusiones

Un mundo de economía globalizada, y con nuevas reglas de competitividad, en el contexto de una Europa Unida, en la que sin duda existen más variedad de controles, a todos los niveles, pero estos encuentran más dificultades en su aplicación, por la ausencia de fronteras, está produciendo cambios en los hábitos de la alimentación animal, y consecuentemente en la producción de estos piensos, derivándose de ello consecuencias en el consumo humano.

Esta nueva situación nos ha sorprendido con problemas sanitarios nuevos relacionados con la alimentación, hasta ahora desconocidos, como es el reciente caso de la variante de la EEB.

El Interés General de la EEB viene dado, de forma particular, por su trascendencia en salud pública, aunque de un modo más teórico que práctico, si se consideran los datos de incidencia actuales. Probablemente las numerosas cuestiones que aún se desconocen o que se conocen parcialmente, tanto respecto de su etiología, como de la patogenia, evolución, diagnóstico y control (tratamiento y prevención), unido al pronóstico de las mismas, han justificado su trascendencia e impacto tanto desde el punto de vista económico, como político, medioambiental, mediático y, en su origen, de sanidad animal y salud pública.

La EEB se presentó de forma epidémica en 1986 en el Reino Unido; pudiendo haber casos en los bóvidos en los años anteriores (1984 y 1985). La epidemia de EEB en el Reino Unido alcanzó su máxima incidencia hacia 1992, descendiendo posteriormente; en el año 2000 todavía se declararon 2.032 casos en Gran Bretaña. El periodo de incubación de los bovinos no es absolutamente conocido, pero se estima en 3 ó 4 años.

A fecha de junio de 2001 se han declarado 101 casos de la vECJ; 97 en el Reino Unido, 3 en Francia y 1 en Irlanda. La cronología hasta Diciembre de 2000, muestra que, con fechas de comienzo, en 1994, 8 casos en el Reino Unido y 1 en Francia; en 1995, 10; en 1996, 11; en 1997, 14; en 1998, 17; en 1999, 24 en el Reino Unido, 2 en Francia y 1 en Irlanda; y datos parciales en 2000, 28. No se ha presentado ningún caso en el mundo ni en otros países de la Unión Europea ni tampoco en España.

Existe una evidencia científica muy clara de que la vECJ se adquiere por ingesta de carnes de bovino infectados por la EEB. Pero los mecanismos detallados no se conocen; a este desconocimiento se debe al largo periodo de incubación, que además no está precisado. Es muy difícil hacer una encuesta epidemiológica sobre lo que se ha comido muchos años antes. De todas formas, todos los expertos creen que el contagio se relaciona con la contaminación de la carne de tejido nervioso y sobre todo con el sistema nervioso central. En algunos de los pocos estudios epidemiológicos, se ha señalado la contaminación por tejidos cerebrales o de médula espinal con ciertas manipulaciones en los mataderos y en las carnicerías. En estudios experimentales no se consigue la transmisión con inóculos con carnes musculosas (filete, bistec). Tampoco se ha conseguido la transmisión por la leche.

El CES constata que el problema tiene una triple dimensión: sanitaria, medioambiental y económica.

Respecto a los aspectos sanitarios de la misma, ha de destacarse que es a la vez enfermedad humana y epizootía animal. En un primer momento, la alarma creada ante el desconocimiento y las dimensiones del problema, llevó tardíamente a actuaciones un tanto desorientadas por parte de las Administraciones, que con el paso del tiempo se han ido reconduciendo a la dimensión de los acontecimientos. Aunque aún quedan muchas incógnitas sin resolver sobre las que se hace necesaria una labor investigadora de cuyos logros depende en buena parte del éxito de las medidas que se tomen, de la eficacia en la lucha contra esta enfermedad.

Sin duda el retraso en comunicar por el Reino Unido a sus socios comunitarios la transmisión al ser humano de esta variante de EEB, retrasó la adopción de medidas de freno a su expansión. Pese a ello en el año 1994, por recomendación del Comité Científico se prohíben las harinas cárnicas para la alimentación de rumiantes en la Unión Europea, esto es antes de confirmarse por parte del Reino Unido el primer caso humano. El CES destaca la importancia de las medidas preventivas en este tema.

De estos hechos se derivan unas importantes consecuencias económicas y para todos los agentes que intervienen en el sector cárnico, sobre todo para el sector ganadero. La sorpresa y magnitud de estos efectos forzó a improvisar soluciones, no siempre las mejores, ante la falta de previsiones y medios, fue la dinámica de los

propios hechos la que impuso correcciones a estas primeras y apresuradas soluciones.

Una reducción importante en la demanda de consumo en un sector productivo, afecta directa o indirectamente, a un buen número de actividades relacionadas con ellos y, por ende, al conjunto del sistema económico. El impacto global en el valor añadido bruto regional de la EEB puede variar en función de la reducción del consumo desde los 4.000 millones de pesetas/año con reducción de la demanda de un 10%, hasta los 16.500 millones de pesetas/año con una reducción del 40%, aunque la hipótesis más plausible la podría situar, con datos actuales en 4.000 millones de pesetas/año (reducción de consumo del 10%) y los empleos afectados se podrían estimar en 1.000. La mayor pérdida de VAB se concentra en el sector ganadero de bovino. Los precios al consumidor se han mantenido estables para las distintas carnes de vacuno y no así para el ganadero, pues en lonja la carne de bovino ha llegado a descender hasta el 35% en los meses de febrero y marzo, para recuperarse posteriormente durante el mes de agosto, lo que podría suponer unos menores ingresos para el ganadero de bovino de 22.000 millones de pesetas en el periodo comprendido entre noviembre 2000 y diciembre 2001 (14 meses). Las pérdidas para este tipo de ganadero van a depender lógicamente de la aparición o no de nuevos casos de EEB.

Están funcionando tres plantas de inertización en nuestra Comunidad. Son necesarias más y su distribución debería guardar relación con la densidad geográfica de la cabaña ganadera, para mejor atención a los ganaderos y, evitar largos traslados de animales, por lo que parece razonable la iniciativa de la Consejería de Agricultura y Ganadería de instalar una nueva planta en la provincia de Salamanca.

La repercusión medio ambiental que los sacrificios de animales y eliminación de harinas cárnicas está planteando, está llevando a diversos ensayos sobre los que la Administración debe hacer un seguimiento para cumplir las normas sanitarias, medioambientales y evitar posibles fraudes en la eliminación de estas harinas. El CES entiende que si la tecnología de esas industrias que están colaborando en la eliminación de las harinas es la adecuada, cualquier sistema de los utilizados es válido en principio. En todo caso, será siempre necesario considerar la posible repercusión económica, en la salud laboral e impacto ambiental. Para ello, se deben incorporar las

medidas de diseño o correctoras de los procesos seleccionados, adaptando las tecnologías existentes o desarrollando otras nuevas para alcanzar dicho objetivo y establecer medidas de control.

III recomendaciones

Primera.- El Consejo recomienda aumentar la líneas de investigación, ya iniciadas en nuestra Comunidad relacionadas con la mejora de la ganadería, búsqueda de especies vegetales idóneas para obtener proteínas bajas en alcaloides, impulsando la urgente creación del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

Segunda.- Es necesaria una eficiente gestión de los residuos materiales específicos de riesgo (MER) que alcance su completa eliminación y destrucción. La Administración regional debe arbitrar los medios necesarios para que la recogida y traslado de los MER se realice con las adecuadas medidas de salubridad.

Respecto a la eliminación de las harinas cárnicas, si finalmente se implementa la incineración como medio de destrucción de las mismas, ha de ser realizada con total garantía sanitaria y medioambiental, (es necesaria la creación de un laboratorio de análisis de dioxinas, etc). Con independencia de analizar el contenido en proteínas y humedad, conviene establecer un programa de análisis de estas harinas que además verifique la posible aparición de elementos extraños al proceso de transformación de los MER.

Tercera.- Son necesarias medidas de control por parte de la Administración Autonómica sobre la cabaña bovina, a través de todas las fases de la cadena de producción y de su alimentación. Incrementando el número de muestras de animales vivos y alcanzando a la totalidad de los sacrificados de más de 24 meses, controlando el correcto etiquetado de los piensos que permita conocer su composición e implantando el etiquetado de las carnes y estudiar la prohibición con carácter definitivo de las harinas cárnicas para todas la especies en tanto no exista certeza sobre la forma de transmisión.

Con todas estas medidas que permiten la identificación del producto desde la explotación hasta su consumo, se estaría en condiciones de trasladar a los consumidores un mensaje de seguridad.

Cuarta.- Se hace necesario, como alternativa a las harinas cárnicas, el fomento de las oleo-proteaginosas, estableciendo líneas de ayuda a este tipo de especies vegetales, que

permitan incrementar su superficie de cultivo y producción. Apoyo a: alfalfas, guisantes, habas, girasoles, etc.

Quinta.- Es necesaria la ordenación del sector ganadero que garantice su mantenimiento: modernización de explotaciones, incorporaciones de jóvenes, apoyo al cooperativismo, acercamiento del sector al mercado, etc.

Sexta.- Es necesaria una ayuda directa de la Administración Regional a la ganadería equiparada a la aportada por el MAPA que garantice la capacidad productiva de estas explotaciones y compense el daño sufrido por esta crisis.

Séptima.- El CES estima necesario que se dote adecuadamente de medios materiales y personales a las unidades veterinarias de la Administración Regional.

ANEXOS

**INCIDENCIA DE LA ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME
BOVINA EN CASTILLA Y LEON**

INTRODUCCION

HIPOTESIS ETIOLOGICAS DE LAS EETs

**LA VARIANTE DE LA ENFERMEDAD DE
CREUTZFELDT-JAKOB (vECJ)**

D. Antonio Rodríguez Torres

INCIDENCIA DE LA ENCEFALOPATIA ESPONGIFORME BOVINA EN CASTILLA Y LEON

INTRODUCCION

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es un proceso degenerativo del Sistema Nervioso Central (SNC) que afecta a los bóvidos, que se detectó en el Reino Unido en 1986. Esta epizootia ha tenido una enorme trascendencia por su repercusión en los aspectos ganaderos, sociales y económicos. A los problemas ganaderos se unieron inmediatamente las repercusiones obligadas al comercio cárnico internacional, en particular en la Unión Europea (UE). A partir de 1996, la EEB se convirtió en un problema de Salud Pública al declararse la posibilidad de transmisión de la EEB al ser humano por ingesta con carnes infectadas.

Para elaborar un informe sobre la incidencia en nuestra Comunidad, parece necesario hacer una introducción doctrinal sobre los conocimientos científicos actuales de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs).

En las décadas de los años 40 y 50 se conocían enfermedades animales y humanas de lenta evolución, con prolongada incubación y cuya etiología no se conocía. En 1954 se introdujo el concepto de **infecciones lentas**, entre las que se incluyeron cuadros muy diversos como el *scrapie* (o tembladera) de las ovejas, el Kuru humano, cuadros degenerativos del SNC (encefalitis, Alzheimer, esclerosis múltiple, etc). El tema de las infecciones lentas proponían en general un agente causal por virus, por supuesto desconocido. Los términos de infecciones lentas y virus lentos designaban un conjunto de síndromes y sus agentes, que se caracterizaban por:

- Un periodo de incubación muy prolongado, que pueden oscilar entre muchos meses y varias décadas.
- Un curso clínico generalmente breve, progresivo y fatal
- Manifestaciones limitadas a un solo órgano o sistema (generalmente el SNC)
- Estricta especificidad del proceso onfinado a una sola especie animal (oveja, hombre)

En la actualidad la denominación de infecciones víricas lentas es difícilmente sostenible. Algunos cuadros no son infecciosos, sino genéticos o de otras etiologías, y

algunos cuadros son tan dispares como la panencefalitis esclerosante (ocasionado por la persistencia del virus del sarampión con la participación de trastornos inmunopatológicos), la leucoencefalopatía multifocal progresiva (producido por el poliomavirus humano JC en inmunodeprimidos), la infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y SIDA, y las ahora conocidas encefalopatías espongiformes transmisibles. Es obvio que entre ellos existen diferencias muy considerables clínicas, epidemiológicas y sobre todo etiológicas, para no mantener la consideración del término de infecciones lentas.

Los cuadros degenerativos del SNC asociados a priones constituyen un conjunto de procesos de los animales y del hombre que si tienen suficiente homogeneidad, no todo por su etiología similar sino también por sus semejanzas clínicas y patológicas.

En los últimos años se está generalizando para todos ellos una denominación genérica de **encefalopatías espongiformes (subagudas) transmisibles (EETs)** propuesta por Gajdusek en 1977. La denominación se refiere al aspecto histopatológico del SNC del animal afectado y al hecho de que natural o experimentalmente pueden transmitirse. La especie animal respectiva añade el apellido, salvo en algunos casos en los que se conocía previamente con un nombre anterior (*scrapie*). En las enfermedades humanas las denominaciones responden al nombre indígena (Kuru) o a los clínicos que identificaron el síndrome o sus características patológicas.

Tras la descripción de los agentes causales por S. Prusiner en 1982, que acuñó el nombre de **prion** (acrónimo de proteína infecciosa) se denominan también como **enfermedades producidas (o asociadas a) por priones (EPs)**. Ambas denominaciones son equivalentes y pueden ser utilizadas indistintamente.

Las denominaciones particulares de diferentes síndromes o enfermedades deben precisar la especie animal, porque la especificidad de especie es muy trascendente en estos procesos. Como indicaremos entre las encefalopatías espongiformes humanas, la denominación atendiendo únicamente a la forma de presentación se presta a confusión.

En muchas de las EETs la infección es transmisible en condiciones naturales, e incluso en otras se puede conseguir experimentalmente en modelos animales. Pero estas enfermedades tienen un determinismo genético del genoma del huésped. Es una situación muy particular, porque estos procesos son a la vez infecciosos y genéticos, un aspecto que analizaremos en el estudio de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob y su nueva variante.

Dada la presentación de algunas en tiempos recientes y su gran importancia en Salud Pública, las EETs constituyen un conjunto de enfermedades que se incluyen en el actual concepto de **infecciones emergentes**. Desde los primeros años de la década de los 80, las enfermedades que emergen o reemergen entre la población, constituyen un reto a la Salud Pública, no solo para un país sino a la total humanidad. Por ello, las administraciones de países, comunidades u organizaciones sanitarias, deben esforzarse en la vigilancia, verificación, control y prevención. El campo es amplísimo, incluidas las fiebres hemorrágicas, las EETs y muchísimos otros procesos.

Para centrar en nuestro informe en la EEB, y su consecuencia la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ), es necesario resumir en dos tablas las enfermedades EETs en los animales y el hombre.

Tabla 1.- ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES ANIMALES

Enfermedad	Especies animales
Tembladera (<i>Scrapie</i>)	Ovejas y cabras
Encefalopatía transmisible del visón <i>Chronic wasting disease</i>	Visones Ciervos yalces
Encefalopatía espongiforme felina	Gatos, otros félidos
Encefalopatía espongiforme bovina (BSE)	Bóvidos
Encefalopatía espongiforme de ungulados exóticos	Nyalas, oryx, muflones...

Tabla 2.- ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES HUMANAS

Enfermedad	Observaciones
Kuru	Sólo en indígenas Fore de Nueva Guinea Ningún caso nuevo desde 1959 (2548 casos)
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)	Presentación esporádica (85%) Presentación familiar (515%) Casos iatrogénicos (200)* Casos vECJ (101)*
Síndrome de Gerstmann-Sträussler -Scheinker (SGSS)	Familiar. Herencia autosómica dominante
Insomnio fatal familiar (FFI)	Familiar. Herencia autosómica dominante Presentación esporádica

* Casos publicados hasta abril de 2001

Todas las EETs tienen unas características comunes:

- Largo periodo de incubación. Desde muchos meses hasta 40 años
- Síndrome progresivo y fatal. La secuencia de las manifestaciones clínicas (ataxia y/o demencia) varía de una a otra enfermedad y de unos ~~casos~~ a otros. No existe fiebre ni reacción meníngea
- Presencia del tejido cerebral de fibrillas características (120nm x 100-500 nm), formadas por agregados proteicos cuyo componente fundamental es la proteína del prión (PrP).
- En tejido nervioso: vacuolización neuronal, picnosis, cromatosis, aspecto esponjiforme, gliosis e hipertrofia astrocitaria
- No aparece respuesta inmunitaria frente a la PrP

HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS DE LAS EETs

Nuestros conocimientos sobre la naturaleza de los agentes causales de las encefalopatías esponjiformes son aún incompletos. El componente fundamental es la proteína del prión, una sialoproteína de 27-30 kilodantons (PrP₂₇₋₃₀). En las células del huésped, tanto sanas como enfermas, existe una proteína natural celular (PrP₃₃₅). La patogenia del proceso aparece iniciarse por la aparición de un cambio en la proteína precursora, probablemente de la conformación de su estructura secundaria y terciaria, bajo la activación por la proteína prión. La proteína precursora modificada es ~~insoluble~~ y se polimeriza en varillas que se acumulan en el tejido cerebral.

Las proteínas prión aisladas y purificadas de animales enfermos o de pacientes, transmiten la enfermedad experimentalmente y no aparecen contener ácido nucléico alguno; todos los intentos para demostrar su presencia han fracasado. En cualquier caso, se ha podido estimar que si existiese un ácido nucléico, no detectable por los métodos utilizados, debería tener un tamaño, número de pares de bases, muy pequeño incapaz de codificar la replicación del prión.

La incógnita fundamental, aunque no la única, de la biología de los priones radica en su mecanismo de replicación. La inoculación experimental al hamster de algunas partículas de proteína prión se sigue de un activo proceso de ~~multiplicación~~ multiplicación.

(V/M). La presentación homocigótica metionina/metionina (M/M) en el hombre, que representa de un 20 a 40% según las series, es el determinismo genético primordial. En los pacientes con ECJ y SGSS se han señalado sustituciones en los codones 102, 177, 200 y 39-40; en el SGSS se ha descrito, además, una inserción en el Orf del gen del prión. En los pacientes con insomnio fatal familiar se ha identificado una mutación en el codón 178. En conjunto, se han identificado al menos 18 mutaciones distintas en diversos codones en el gen PrP en el hombre.

La replicación de los priones, en condiciones naturales y experimentales, ante la presencia externa del PrP^c, PrP^{BSE} o PrP^{ECJ}, supone el necesario **paso de información desde proteína a proteína**. Esta es la etapa que más concentra actualmente el debate científico que no está aún aclarado y cuyos mecanismos no están completamente definidos. Se postula la intervención de otras proteínas (proteína X; moléculas proteicas de las familias de las chaperonas y chaperoninas) y se ha descrito recientemente la posibilidad de que participe otro segundo gen, separado del gen PrP, producto de una proteína Y.

En cualquier caso, se analiza al estudiar la biología de los priones, la transformación desde PrP^c a PrP^{Sc} es un proceso de cambio posttraslacional de las proteínas en su conformación molecular (isoformas), como se observa en la **figura**, tomada de Prusiner, 1996.

LA VARIANTE DE LA ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB (vECJ)

Para introducirse en el estudio de la **variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)**, es necesario hacer un breve recuerdo de las enfermedades del hombre (**Tabla 2**) para que la opinión pública no confunda unas enfermedades con otras.

El **Kuru** fue una ETT localizada en Papua Nueva Guinea, que se transmitía por canibalismo ritual funerario, al comer cerebro de los predecesores difuntos. La enfermedad desapareció en 1959.

El **síndrome de Gerstmann-Straussler-Schenker (SGSS)** se presenta en familias con una predisposición hereditaria y lo mismo ocurre con el **insomnio fatal familiar (IFF)**, enfermedad en que se han descrito casos esporádicos recientemente. Ambos síndromes son raros y se concentran en varias decenas de familias.

La EET mas importante en el hombre es la **enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)**, cuya entidad se confunde en muchos casos con la variante ECJ, relacionada con la EEB, que como describiremos es muy diferente de la ECJ y que, a nuestro juicio, debería tener un nombre diferente que evitará errores conceptuales.

La ECJ (**Tabla 2**) se presenta, en sus aspectos clínicos y epidemiológicos, en cuatro formas:

1.- Esporádica.- Es una enfermedad descrita por psiquiatras austriacos hacia el año 1920 (H.G. Creutzfeldt y A.M. Jakob). Ocurre en casos esporádicos que afectan alrededor de una persona por millón de habitantes al año en toda la población mundial; habitualmente los casos tienen una edad superior a 55 años y la media de la fecha de muerte es de unos 68 años. La enfermedad tiene una duración de >14 meses. La forma esporádica es de origen desconocido e incluye factores genéticos. Los enfermos manifiestan pobre concentración, letargo, desequilibrio, agitación, demencia y espasmos musculares. La duración de la enfermedad es muy corta, no mucho más de cuatro meses. Los pacientes muestran un trazado en la electroencefalografía (EEG) muy característica, con complejos de ondas agudas. En la anatomía patológica se presentan cambios espongiiformes, pérdida neuronal y astrocitos. La forma esporádica supone el 85-90% de los casos.

Es importante recordar estas características de la ECJ esporádica para diferenciar la variante relacionada con la EEB.

2.- Familiar.- Tiene características de la forma esporádica pero se presenta en *clusters* en familias, como un carácter hereditario autosómico. Parecen más frecuentes en algunas etnias. Implica a un 5-10% de los casos.

3.- Iatrogénica.- La transmisión interhumana de la ECJ se descubrió por primera vez en 1974 a través de trasplantes de córnea y posteriormente tras implantación de electrodos EEG en cirugía de la epilepsia, en injertos de dura madre y otras intervenciones de neurocirugía. A partir de 1985 se publicaron casos de ECJ tras la administración de hormona de crecimiento natural obtenida de cadáveres, para el tratamiento del enanismo; en 1992 se produjo una epidemia de esta etiología en Francia. En este momento se han presentado unos 200 casos iatrogénicos.

Estas tres formas de presentación de la ECJ son similares en su clínica y en su etiología, con las diferencias genéticas y epidemiológicas entre ellas. Son verdaderas ECJ con las cepas prión de origen humano.

Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vECJ)

La EEB se presentó de forma epidémica en 1986 en el Reino Unido; pudieron haber casos en los bóvidos en los años anteriores (1984 y 1985). La epidemia de EEB en RU alcanzó su máxima incidencia hacia 1992, descendiendo posteriormente; en el año 2000 todavía se declararon 1500 casos de *vacas locas* en Gran Bretaña. El periodo de incubación en los bóvidos no es absolutamente conocido, pero se estima en 3 ó 4 años.

En Marzo de 1996 la *Spongiform Encephalopathy Advisory Committee* (SEAC) británica publicó diez casos de ECJ ocurridos en personas jóvenes y por sus características admitió que podían ser causadas por el prión de la EEB. Posteriormente se publicaron en diversas revistas científicas y se precisó la transmisión de la EEB a la especie humana, denominándose nueva variante ECJ y finalmente **variante de la ECJ (vECJ)**.

Las evidencias científicas de la transmisión se publicaron en 1997. En el momento actual, es evidente que la vECJ es una enfermedad diferente de las ya conocidas presentaciones de la ECJ. La cepa priónica es otra (EEB), el periodo de incubación puede ser distinto (y no se conoce), la edad de los pacientes es mucho más precoz, la sintomatología es diferente de la ECJ y también su duración, la anatomía patológica del cerebro y cerebelo es también distinta, los datos de la ECG no son características y si son diagnósticos los datos de la resonancia nuclear magnética (RNM) y los priones se encuentran en el tejido linfoide (amígdalas) que no están allí en la ECJ. Por estas razones, el término de vECJ es inadecuado. Debería ser otra la denominación, pero por el momento esta se utiliza en toda la bibliografía científica.

A la fecha de este informe (junio 2001) se han declarado 101 casos de la vECJ; 97 en Reino Unido, 3 en Francia y 1 en Irlanda. La cronología hasta Diciembre de 2000, muestra que, con fechas de comienzo, en 1994, 8 casos en RU y 1 en Francia; en 1995, 10; en 1996, 11; en 1997, 14; en 1998, 17; en 1999, 24 en RU, 2 en Francia y 1 en Irlanda; y datos parciales en 2000, 28. No se ha presentado ningún caso en el mundo, en otros países de la Unión Europea y por supuesto tampoco en España.

Cuadro clínico.- Las características de la historia clínica de los enfermos de vECJ han sido definidas por diversas comisiones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). No existe un criterio único para una vECJ.

Tabla 4.- Características clínicas (A)

Síntomas psiquiátricos precoces
Parestesias / disestesias persistentes precoces
Ataxia
Corea / distonia o mioclonias
Demencia
Mutismo aquinético

La sospecha de vECJ se refuerza con otros criterios

Tabla 5.- Otras características (B)

Ausencia de historia potencial iatrogénica
Duración clínica >6meses
Ausencia de la proteína 143-3 en LCR
Edad de comienzo <50 años
Ausencia de mutación en el gen PrP (consentimiento informado)
Homocigotosis metionina en el codon 129(consentimiento informado)
La EEG no muestra el trazado típico
La investigación del paciente no sugiere otro diagnóstico alternativo
La RNM muestra imagenes bilaterales anormales

Un paciente con un desorden neuropsiquiátrico progresivo que presenta 5 de los síntomas de la Tabla 4 y todos los criterios de la Tabla 5, debe ser considerado como un casos de sospecha de vECJ.

Anatomía Patológica.- Los aspectos neuropatológicos de la vECJ son diferentes de los que se encuentran en las otras formas de la ECJEn la vECJ se observan:

Una encefalopatía espongiforme con abundante depósitos de PrP, en particular en placas múltiples fibrilares de PrP, rodeadas de un halo de vacuolas espongiformes (placas "floridas") y depósitos amorfos pericelulares y perivasculares prominentes en la capa molecular del cerebelo.

Consideraciones sobre la transmisión y contagio

Existe una evidencia científica muy clara de que la vECJ se adquiere por ingesta de carnes de bóvidos infectados por la EEB. Pero los mecanismos detallados no se conocen; a este desconocimiento se debe al largo periodo de incubación, que además no está precisado. Es muy difícil hacer una encuesta epidemiológica sobre lo que se ha comido muchos años antes. De todas formas, todos los expertos creen que el contagio se relaciona con la contaminación de la carne con tejido nervioso y sobre todo con el SNC. En algunos de los pocos estudios epidemiológicos, se ha señalado la contaminación por tejidos cerebrales o de médula espinal con ciertas manipulaciones en los mataderos y en las carnicerías. En estudios experimentales no se consigue la transmisión con inóculos con carnes musculosas (filete, bistec). Tampoco se ha conseguido la transmisión por la leche. Todos los expertos, consideran que los productos cárnicos recuperados mecánicamente pueden contener una importante cantidad de priones si se parte de un animal infectado. Por ello, algunos epidemiólogos han sugerido que los productos cárnicos más peligrosos fueron, en el inicio de esta infección, las hamburguesas y las salchichas.

Un aspecto interesante es considerar la posibilidad de transmisión por transfusión con sangre de un donante que posteriormente presenta una vECJ. Se ha demostrado recientemente la transmisión experimental por este mecanismo de un bovino (EEB) a un ovino. A pesar de este dato, los estudios realizados no han demostrado la transmisión interhumana por transfusión, pero es una experiencia alarmante. En todo caso, el problema está actualmente confinado al Reino Unido. Suministro de sangre en otros países no deben ser considerados actualmente de riesgo.

Predicción del número futuro de casos de vECJ: Se han hecho diversos modelos de predicción, en función de diversas circunstancias a valorar.

El número final de casos dependerá de:

- Duración del periodo de incubación en el hombre. No se conoce.
- La resistencia a la transgresión de la barrera de especie bovino-hombre. Parece que es importante

- La presencia de los homocigotos con metionina en el codon 129 en la población. Supone hasta menos del 40%. Este carácter parece conferir inmunidad a la vECJ (o quizás aumentar la duración de la incubación)

Con una predicción sugerida por Patison en 1998, y con un periodo de incubación de 10 años como media, se postulaba una cifra previsible de unos 200 casos totales. En 2001 se conocen solo la mitad (101).

La predicción de casos está también en relación con los casos de EEB en un país. Las diferencias son abismales: 180.000 casos de vacas locas en R.U., mientras que en España se cifran actualmente alrededor de 50 casos.

Igualmente, el futuro de casos esta influido por las medidas preventivas introducidas con las normas sucesivas de la Unión Europea y por los Estados miembros.

En resumen, la visión actual de los posibles casos futuros es ahora bastante optimista, pero nadie puede asegurar la evolución próxima. El optimismo procede de las medidas adoptadas en estos últimos años.

Diagnóstico de la vECJ

El diagnóstico, bien sea clínico, con las pruebas de laboratorio y con las exploraciones de la ciencia médica actual, es tardío. La sospecha y la confirmación se alcanza en un estado clínico muy avanzado. Y en todo caso debe confirmarse con una necropsia muy rigurosa. Los pasos diagnósticos utilizan diversos medios.

Clínico. Se basa en los síntomas y cuadros que se indican en las Tablas 4 y 5.

Historia epidemiológica

Análisis genético Que exige la obtención de un consentimiento informado

Análisis sanguíneos. Existen diversas técnicas no validadas hasta el momento (Clonagen).

Biopsia de amígdalas. En la vECJ los priones se pueden demostrar en el tejido tonsilar. No en la ECJ clásica. Esta biopsia evita la biopsia cerebral, que no debería hacerse, salvo para casos diferentes y tratables.

Análisis en LCR.- La presencia de una proteína 143-3 es inconstante en la vECJ o no aparece. De todas formas, su presencia no diferencia los tipos de ECJ.

Diagnóstico por imagen.- La tomografía axial computerizada (TAC) no es eficaz para el diagnóstico. En cambio, es muy satisfactoria la utilización de la resonancia nuclear

magnética (RNM), que es sólo diagnóstica en la vECJ. Muestra imágenes características en el tálamo posterior.

Electroencefalografía (EEG).- El trazado típico que se registra en la ECJ, no aparece en la vECJ, por lo que el EEG no tiene validez diagnóstica.

Vigilancia de las EETs humanas

Como consecuencia de la importante repercusión en Salud Pública de la incidencia en la población de las EET humanas, en particular la ECJ, y posteriormente la vECJ, se reguló en España la Declaración Obligatoria, incluyéndolas en la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en 1995. Con verificación retrospectiva desde 1993 y prospectivamente desde 1996, se creó un Registro Nacional. Desde 1993 se han declarado los siguientes casos en España.

Tabla 6.- Casos de EETs humanas en España (1993-2000)

ECJ esporádicos	306
ECJ familiares	14
ECJ iatrogénicos	3
vECJ	0
SGSS	1
IFF	14

Datos actualizados en Febrero 2001

**ENCEFALOPATÍA
ESPONGIFORME BOVINA (EEB)**

**ASPECTOS DE SANIDAD ANIMAL
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA**

D. Elías F. Rodríguez Ferri

LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES (EE)

Con carácter general se diferencian 3 tipos de Encefalopatías Espongiformes (EE); las EE infecciosas, transmisibles (EETs), las EE familiares, de carácter hereditario y, finalmente, las EE esporádicas.

El prototipo de las primeras es, sin duda alguna, el *scrapie* o prurito lumbar ovino, una enfermedad neurológica de las ovejas conocida desde 1732 en el Reino Unido (McGowan, 1922) y presente en la actualidad en muchos países.

Su transmisibilidad fue demostrada por Cuillé y Chelle en 1936 mediante inoculación de médula espinal de ovejas enfermas en otras sanas por vía intraocular, desarrollando síntomas clínicos después de un periodo de incubación extraordinariamente largo, hasta 14 y 22 meses. En los años posteriores, se demostró la transmisión experimental a otras especies como cabras, ratones, ratas y *hamsters* (Chandler, 1961, 1962, 1963; Chandler y Fisher, 1963; Cuillé y Chelle, 1939; Zulianello *et al.*, 2000), igualmente por vía intraocular, confirmando las observaciones primitivas y destacando una marcada especificidad de especie que dificulta la transmisión interespecífica (Pattison, 1966). El largo periodo de incubación que se observó en los experimentos, especialmente en el primer pase, se observa, incluso entre especies fuertemente relacionadas desde el punto de vista filogénico (Scott *et al.*, 1989).

En los años cincuenta Hadlow (1959) destacó la gran similitud entre el prurito lumbar ovino y el 'kuru', una enfermedad endémica de la tribu Fore de Papua Nueva Guinea (Gajdusek y Zigas, 1957, 1959; Klatzo *et al.*, 1959; Zigas y Gajdusek) cuya transmisibilidad se demostró en chimpancés y a la que se relacionó con prácticas caníbales en el hombre. La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), que manifiesta una neuropatología semejante a la del kuru, fue descrita por Klatzo *et al.*, en 1959 y su transmisibilidad fue demostrada en animales de experimentación en los años siguientes (Gibbs *et al.*, 1968).

Desde entonces han sido descritas otras enfermedades que ya fueron clasificadas, en conjunto, como encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), incluyendo el síndrome

de Gertsmänn-Straussler-Sheinker (SGSS) en el hombre (Takahashi *et al.*, 1999; Tateishi *et al.*, 1990), la encefalopatía transmisible del visón (ETV) (Burger y Harsough, 1965) y la caquexia crónica del ciervo y del alce (CCCA) (Williams y Young, 1980, 1982).

Más recientemente se han descrito formas nuevas en el ganado doméstico, incluyendo la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) (Wells *et al.*, 1987), la encefalopatía espongiiforme felina (EEF) en los gatos y otros miembros de la familia *Felidae* (Wyatt *et al.*, 1990) y la encefalopatía espongiiforme de los ungulados salvajes exóticos (EUE) en otras especies de rumiantes salvajes como el nyala, antilope, órix de Arabia y gran kudú (Jeffrey y Wells, 1988; Kirkwood *et al.*, 1990).

Tabla 1. EETs

Enfermedad	Tipo	Hospedador
SC (Scrapie o prurito lumbar ovino)	Infecciosa (en animales susceptibles)	Ovejas y cabras
EEB (encefalopatía espongiiforme bovina)	Infecciosa (harinas contaminadas priones))	Bovinos
ETV (encefalopatía transmisible del visón)	Infecciosa (priones de ovejas o bovinos)	Visón
EEF (encefalopatía espongiiforme felina)	Infecciosa (harinas contaminadas priones)	gatos
EUE (encefalopatía de los ungulados exóticos)	Infecciosa (harinas contaminadas priones)	Gran kudú,nyala, orys
Kuru	Infecciosa (canibalismo)	Tribus salvajes Papua
ECJ (enfermedad de Creutzfeldt - Jakob)-variante	Infecciosa (consumo de carne contaminada)	Hombre
ECJ-iatrogénica	Infecciosa (hormonas, transplante,..)	Hombre
ECJ-familiar	Hereditaria (mutaciones linea germinal)	Hombre
SGSS (síndrome de Gerstmänn - Straussler-Sheinker)	Hereditaria (mutaciones linea germinal)	Hombre
IFF (insonmnia familiar fatal)	Hereditaria (mutaciones linea germinal)	Hombre
ECJ-esporádica	Mutación somática (hereditaria) esporádica	o Hombre
IEF (insomnio esporádico familiar)	Mutación somática (hereditaria) esporádica	o Hombre
CCCA (caquexia crónica del ciervo y el alce)	Desconocido	Ciervo y Alce

LAS EETs EN SANIDAD ANIMAL Y SALUD PÚBLICA

Con la notable excepción del *scrapie* o tembladera ovina, las EETs de los animales no han representado, hasta recientemente, un problema de atención principal en el mundo animal (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001). El prurito lumbar ovino, que en la actualidad está distribuido por todo el mundo en mayor o menor grado, si que representa un problema de importancia en el Reino Unido (RU), donde por término medio se describen alrededor de 250-260 rebaños positivos anualmente (Informe Phillips, 2000). La incidencia en España, por ejemplo, es escasa y en los últimos años se han descrito algunos focos en Navarra y Castilla La Mancha (García del Jalón, 1996, 2001) casi siempre relacionados con la importación de animales desde el RU, con fines de mejora.

La EEB y, con ella, los procesos satélites (ETV, EUE, EEF) relacionados, han representado desde su aparición un problema de sanidad animal muy importante que ha obligado a sacrificios masivos de la cabaña ganadera, especialmente en el RU, con fuertes repercusiones económicas y sociales. Sin embargo, con ser ello muy importante, desde que en 1996 se estableció como probable su relación con la vECJ, su interés trascendió al plano de la Salud Pública, convirtiéndose en la enfermedad estrella de los últimos años, con una desmesurada atención por parte de los medios de comunicación y los ámbitos sociales, laborales y políticos, que ha producido consecuencias catastróficas para el sector bovino en general y, por su relación, también en muchos otros que mantienen con él vinculaciones mas o menos estrechas (Rodríguez Ferri, 2001).

LAS INFECCIONES EMERGENTES

En los últimos veinte o veinticinco años, determinados procesos caracterizados por su aparición súbita y rápida expansión, cuando no en atención a otros aspectos que tienen que ver con su virulencia u otros relacionados con la transmisión o el control, a los que se ha venido en denominar 'Enfermedades Emergentes' han centrado poderosamente la atención de médicos, veterinarios y otros técnicos de la salud humana o animal.

Desde 1982, muy especialmente, a partir de los trabajos pioneros llevados a cabo en los EE.UU. por los NIH y el CDC (Lederber, 1992; Vidaver, 1996; Shadduck, *et al.*, 1996), se ha configurado una auténtica doctrina que estudia determinadas enfermedades desde una perspectiva diferente a como venía desarrollándose hasta entonces. Hoy, los problemas emergentes, del hombre o de los animales, son objeto de tratamiento específico y de estudio singular por parte de revistas especializadas del mayor rango científico, convocándose

periódicamente reuniones, congresos y simposia nacionales e internacionales para el intercambio de puntos de vista y comunicación de resultados. Se dice que estas enfermedades han acortado la dimensión del planeta pues su interés elimina fronteras y une a los técnicos y científicos de todo el mundo.

LA EEB. UNA ZONOSIS NUEVA Y EMERGENTE

Las zoonosis son enfermedades que comparten el hombre y los animales, aunque uno de los dos no llegue a padecerla y, simplemente, actúe como un reservorio del agente. La EEB se considera una zoonosis pues se admite que el hombre puede contagiarse por consumir carne procedente de animales enfermos.

Aunque nunca ha podido demostrarse de forma directa tal transmisión, por razones obvias, diversos estudios del agente de la misma (incluyendo el periodo de incubación en el ratón, el modelo de glucosilación molecular, el patrón y distribución de la vacuolización neuronal o el perfil de proteólisis endógena o exógena de las proteínas causales, parecen dejar pocas dudas de que éste conduce a la producción de un tipo de enfermedad humana que se ha venido reconociendo como '*nueva variante*' o simplemente, '*variante*' de la enfermedad de Creutzfeldt -Jakob (vECJ).

Si bien la primera sospecha de tal relación se hizo pública cuando el Secretario de Salud inglés, Mr. Stephen Dorrell reconoció ante el Parlamento británico, el 20 de marzo de 1996, que un conjunto de diez casos 'atípicos' de la ECJ podrían estar relacionados con la EEB o, al menos, que esa era la mejor explicación posible, lo cierto es que desde 1988 se habían estado adoptando medidas considerando esa hipótesis, pese a que tal evidencia siempre se considerase oficialmente como remota o muy poco probable. En 1990 se creó en Gran Bretaña una comisión específica, para el estudio de la relación entre ambas enfermedades.

INTERÉS GENERAL DE LAS EETs, EEB y vECJ

Viene dado, de forma particular, por su transcendencia en salud pública, aunque de un modo más teórico que práctico, si se consideran los datos de incidencia actuales. Probablemente las numerosas cuestiones que aún se desconocen o que se conocen parcialmente, tanto respecto de su etiología, como de la patogenia, evolución, diagnóstico y

control (tratamiento y prevención), unido al pronóstico de las mismas, han justificado su trascendencia e impacto tanto desde el punto de vista económico, como político, medioambiental, mediático y, en su origen, de sanidad animal y salud pública.

HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS DE LAS EET

Las inusuales propiedades que manifestaba el posible agente infeccioso de estas enfermedades, aún por describir, centraron la atención de los investigadores ya desde el comienzo de los años 60, suscitándose todo tipo de hipótesis sobre su naturaleza. Desde las que sostenían su condición parasitaria (sarcosporidios) a las que postulaban propuestas de un supuesto origen vírico, debido a viroides o a virinos.

En relación con los virus se suscitó la implicación de virus lentos, denominación que, precisamente, fue registrada por Bjorn Sigurdsson en 1954, para referirse a los casos de *scrapie* y visna en ovejas de Islandia, destacando el largo periodo de incubación, en ocasiones hasta 10 años o más (Flint *et al.*, 2000). Los viroides son agentes infecciosos simples, constituidos por una pequeña molécula (solo 300 -400 nucleótidos) circular de ARN, no codificante, que se replica merced a la intervención de enzimas del hospedador, bien conocidos en patología vegetal donde son causa de importantes enfermedades. Finalmente, los virinos, son fragmentos diminutos de ácido nucléico que aparecen revestidos por una proteína hospedadora.

Cuando se descubrió que la infectividad del agente resistía la acción de las radiaciones ultravioleta y ionizantes, surgieron nuevas explicaciones a favor de la presencia de un ácido nucléico desnudo, infeccioso. También se propuso el término 'virus no convencional', aunque nunca se dieron detalles estructurales respecto de su diferenciación de los virus normales.

Más adelante, cuando se dispuso de protocolos eficaces para la preparación de fracciones parcialmente purificadas de cerebros de *hamsters* infectados, pudo demostrarse que los tratamientos con proteasas eran, parcialmente resistidos y que la materia infectiva era insoluble a los detergentes (Caughey *et al.*, 1997). En sentido contrario, ni pudo demostrarse la existencia de ácidos nucléicos ni de polinucleótidos, lo que justificaba la resistencia a las radiaciones ultravioleta de 254 nm de λ .

BIBLIOGRAFÍA

Burger, D. & G.R. Hartsough. 1965. Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J. Infect. Dis.* 115: 393-399

Caughey, R., Raymond, G.J., Kocisko, D.A. & P.T.Landsbury. 1997. Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie associated prion protein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.*, 71:5, 4107-4110

Chandler, R.L. 1961. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet.* 1:1378-1379

Chandler, R.L. 1962. Encephalopathy in mice. *Lancet.* 1:101-108

Chandler, R.L. 1963. Experimental scrapie in the mouse. *Res. Vet. Sci.*, 4:276-285

Chandler, R.L. & J. Fisher. 1963. Experimental transmission of scrapie. *Lancet.* 2:1165

Cuillé, J. & C.L. Chelle. 1936. La maladie dite tremblante du mouton est inoculable?. *CR. Seances Acad. Sci.* (Paris) 203:1552-1554

Cuillé, J. & P.L. Chelle. 1939. Experimental transmission of trembling to goat. *C.R. Seances Acad. Sci.* 208:1058-1060

Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.MN., Racanjello, V.R., Skalka, A.M., Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press. Washington, 2000

Gajdusek, D.C. & V. Zigas. 1957. Degenerative diseases of the central system in New Guinea: the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl.J.Med.* 257:974-978

Gajdusek, D.C. & Zigas, V. 1959. Kuru: clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the Eastern Highlands of New Guinea. *At. Med.*, 26:442-469

García del Jalón, J.A. 1996. BSE: un desastre anunciado. *Méd. Vet.*, 13:5, 261-262

García del Jalón, J.A., 2001. Comunicación personal

Gibbs, C.J.J., Gajdusek, D.C., Asher, D.M., Albers, M.P., Beck, E., Dan, M. & W.B. Matthews. 1968. Creutzfeldt-Jakob disease (subacute spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161:388-389

Hadlow, W.J. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet* 2, 289-290

Jeffrey, M. & G.A. Wells. 1988. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet. Pathol.* 25:398-399

Kirkwood, J.K., Wells, G.A., Wilesmith, J.W. Cunningham. A.A. & J.S.I. 1990. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Orys leucorys*) greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*) *Vet.Rec.* 127:418-420

Klatzo, I., Gajdusek, D.C. & V. Zigas. 1959. Pathology of kuru. *Lab. Inv.* 799-847

McGowan, J.P. 1992. Scrapie in sheep. *Scott. J. Agric.*, 5:365-375

Pattison, I.H. 1966. The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent. *Res. Vet. Sci.*, 7: 207-212

Lederber, J. *et al.*, (edit.). Emerging infections. Microbial threats to health in the United States. Nat. Academic. Press. Washington D.C. 1992

Lord Phillips of Worth Matravers, J. Bridgeman & M. Ferguson-Smith. 2000. The BSE Inquiry open.gov.uk

Rodríguez Ferri, E.F. 1996. Encefalopatías espongiiformes. Priones. Mesa Redonda sobre Encefalopatías espongiiformes. Colegio Oficial de Veterinarios de León-Facultad de Veterinaria. Junio

Rodríguez Ferri, E.F. 1996. Encefalopatía espongiiforme bovina. Etiología y epidemiología. Colegio Oficial de Veterinarios de Zamora. Mesa Redonda. Octubre.

Rodríguez Ferri, E.F. 1998. Riesgos emergentes. Priones. Diplomados en Sanidad (1997-2000).

Rodríguez Ferri, E.F. 2001. Priones. Un nuevo tipo de agentes transmisibles. *Prod. Anim.*, 162:3-40

Rodríguez Ferri, E.F., Moreno Garcia, B., Alvarez Martínez, M. & J.F. García Marín. 2001. Lo que Ud. debe saber de los Priones y el Mal de las Vacas Locas. Caja España. Colección de Cartillas Divulgativas. Núm. 9

Scott, M., Foster, D., Miranda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., Westway, D. & S.B. Prusiner. 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 59:847-857.

Shadduck, J.A., Storts, R. & G. Adams. 1996. Selected examples of emerging and reemerging infectious diseases in animals. *ASM News*, 62:11, 586-588

Takahashi, H., Takahashi, R.H., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T. & K. Nagashima. 1999. Characterization of antibodies raised against bovine-PrP-peptides. *J. Neurovirol.* 5:3, 300-307

Tateishi, J., Kitamoto, T., Doh, U.K., Sakaki, Y., Steinmetz, G., Tranchant, S., Warter, J.M. & N. Heldt. 1990. Immunochemical, molecular genetics and transmission studies on a case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *J. Neurology.* 40. 1578-1581.

Vidaver, A.K. 1996. Emerging and reemerging infectious diseases. *ASM News* 62:11, 583-585

Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Dawson, M. & R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121:419-420

Williams, E.S. & S. Young. 1980. Chronic wasting disease of captive deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.*, 16:89-98

Williams, E.S. & S. Young. 1982. Spongiform encephalopathy in a Rock Mountain Elk. *J. Wildl. Dis.*, 18:465-471

Wyatt, J.M., Peardon, G.R., Smerdon, T.N., Gruffydd-Jones, T.J. & G.A.H. Wells. 1990. Spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* 126:513

Zigas, V. & D.C. Gajdusek. 1957. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australia and New Guinea. *Med.J.Austr.* 2, 745-754

Zulianello, L., Kaneko, K., Scott, M., Erpel, S., Han, D., Cohen, F.E. & S.B. Prusiner. 2000. Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *J. Virol.*, 74:9, 4351-4360

PRIONES

Para explicar la causa de las EE, Stanley B. Prusiner, de la Universidad de California, propuso en 1982 su hipótesis del prión (Prusiner, 1982, 1984, 1994, 1995), cuyos antecedentes se encuentran en la propuesta realizada en 1967 por J. S. Griffith, quien

sugirió, por primera vez, que en el *scrapie* ovino podía estar implicada una proteína del hospedador, sin participación de ácido nucléico vírico; sin duda alguna que este pensamiento constituyó la primera hipótesis del origen “*solo proteína*” de este tipo de enfermedades. Debe reconocerse, también, que en 1981, P. Mertz y colaboradores, describieron las ‘*fibrillas asociadas al scrapie*’ (SAF o FAS) en el cerebro y señalaron la posibilidad de concentrar la actividad infectante mediante centrifugación (Flint *et al.*, 2000).

Un prión es una partícula infecciosa proteinácea (*proteinaceous and infectious particle*) a la que, según la propuesta, se considera el agente de las encefalopatías espongiformes del hombre y los animales y está compuesto, exclusivamente, por una clase simple de molécula protéica. El prión fue denominado **PrP** (por ‘*Prion Protein*’) y en atención a los modelos de estudio sobre el *scrapie* ovino, el prión infeccioso fue denominado **PrP^{Sc}**. La propuesta supone, pues, la existencia de una proteína del hospedador, modificada, capaz de convertir las proteínas normales en otras similares.

La propuesta de Prusiner ha venido captando adeptos progresivamente. Como reconocimiento de ello, su autor recibió primero el Premio Albert Lasker en 1994 y en 1997, el Premio Nobel, lo que supuso, sin duda, un reconocimiento científico de la comunidad internacional.

Así pues, admitido esto, las enfermedades priónicas representarían un mecanismo patogénico completamente nuevo, basado en un cambio en la conformación protéica, de carácter autopropagativo. En su favor, la reciente descripción en levaduras y hongos filamentosos, de moléculas que se comportan como los priones (en *Sacharomyces cerevisiae* y en *Podospora anserina*, se ha descrito priones o moléculas semejantes a ellos, como Ure3, Psi y Het-s (Coustou *et al.*, 1997; Wickner, 1995; Wickner *et al.*, 1999) cuyo interés como modelo

En cualquier caso es preciso reconocer que la prueba definitiva del modelo ‘solamente proteína’ todavía no se ha llevado a cabo con éxito. Ello supondría la producción de infectividad de novo en una prueba en tubo mediante la manipulación experimental de PrP sintético o recombinante. La ausencia de esta evidencia no invalida, sin embargo, la hipótesis del prión, pero puede infravalorar la dificultad de reconstituir esta transformación molecular.

Nuevas propuestas etiológicas: Frente a la hipótesis de responsabilizar a una proteína única de estos procesos, otros investigadores han considerado que la explicación resulta insuficiente. Señalan estos, que las proteínas, que se sepa, nunca han transportado información, por lo que podría ser que los priones ayudaran de algún modo a un agente infeccioso o aumentaran la susceptibilidad al mismo. Así surgió la hipótesis del virino, que postula que las partículas infecciosas consistirían en un pequeño ácido nucléico recubierto por una proteína del hospedador (Dickinson y Outram, 1988). Las variaciones en la secuencia del ácido nucléico podrían dar lugar a la existencia de distintas cepas (lo que ciertamente ocurre en la práctica, aunque también existen datos que indican que una cepa puede cambiar o mutar), como ocurre en los viroides, pero su pequeño tamaño impediría, normalmente, la capacidad de codificar cualquier tipo de proteína. Se justifican algunas propiedades físicas singulares (por ejemplo la resistencia al calor) en la capacidad protectora de la proteína. Como se ha señalado, la propuesta sugiere como principal candidato para esa cubierta protectora el PrP^{Sc}, a favor de lo cual se había sugerido ya la copurificación de PrP^{Sc} con la infectividad y, contrariamente. Alternativamente se sugirió, también, que la infectividad podía estar asociada a una subpoblación de moléculas PrP^{Sc} denominadas PrP* (Weissmann, 1991), que podrían escapar a la de tección a causa de su extrema rareza o de la dificultad para diferenciarlas del resto de PrP^{Sc}.

Además, se han propuesto también otras explicaciones, incluyendo la posible implicación de organofosforados, como es sabido, compuestos utilizados como pesticidas para el tratamiento del ganado vacuno contra diversas parasitosis por invertebrados, quienes fueron invocados desde el comienzo de los años ochenta como una posible causa de la EEB, en particular por parte de un ganadero de Somerset quien relacionó las campañas de lucha contra estos insectos en Inglaterra y Gales desarrolladas en 1982, como causa del proceso (Purdey, 1982), responsabilizándoles de la neurodegeneración debido a su conocida actividad anticolinesterasa y la muerte celular. Del mismo modo se ha reclamado, también, una etiología autoinmune para explicar el origen, basándose en el hecho de que los ratones que carecen de un sistema inmune funcional no desarrollan el scrapie después de la exposición al material infeccioso por escarificación de la piel (Taylor et al., 1996), sugiriéndose que las células del sistema inmune son precisas para transportar el agente desde el lugar de inoculación al cerebro e interpretándose, por algunos

investigadores, como que esta implicación sería la responsable íntima del proceso (Tiwana et al., 1999). En la actualidad, ni una explicación, ni otra, parecen consistentes.

En los años 80 se propuso, también, que *Spiroplasma mirum* daba lugar a un tipo de fibrillas proteicas resistentes a las proteasas y que, como en el caso de tejido nervioso procedente de casos de ECJ, reaccionaba con antisueros para las FAS (fibrillas asociadas al scrapie) en estudios de western immunoblot lo que permitía sospechar similitudes entre ambos tipos de proteínas (Bastian et al., 1987). En la misma línea se ha propuesto también que *Mycoplasma hyorhinis* produce una proteína resistente a la proteínasa K, semejante a los priones, cuya reversión se produce como consecuencia de la desnaturalización (Butler et al., 1991).

Las enfermedades priónicas son, en cualquier caso, singulares, en el sentido de que pueden tener lugar tanto como consecuencia de la herencia como debido a una infección. Por ejemplo, el 10% de los casos de ECJ y todos los casos de SGSS y de un porcentaje de IFF, están íntimamente relacionados con mutaciones de la línea germinal en el gen PrP del cromosoma 20. Se piensa que las mutaciones favorecen la conversión espontánea de PrP^C a PrP^{Sc} sin necesidad alguna de contacto con el agente infeccioso; en otros casos, la conversión espontánea, también se puede producir sin necesidad de mutación (tercer tipo de procesos). Las mutaciones puntuales, debidas a cambios o deleciones, tienen lugar en el extremo C-terminal de la molécula de PrP y se asocian, indistintamente con ECJ, SGS ó con IFF. Mutaciones debidas a inserciones que se asocian con ECJ, se presentan en la mitad N-terminal de la proteína y suponen la incorporación de 1 a 9 copias adicionales de un octapéptido repetido que normalmente está presente en un número de 5 copias. En el hombre, un polimorfismo en el codón 129, que puede codificar indistintamente metionina o valina, es capaz de influir profundamente en las características fenotípicas de la enfermedad causada por mutaciones patogénicas en otras posiciones. Aunque ellas se incrementan espontáneamente como resultado de una mutación PrP, las enfermedades priónicas de carácter familiar, son transmisibles a los animales de laboratorio, lo que demuestra que la mutación indujo la formación de priones infecciosos.

Argumentos a favor de la hipótesis del prión: El propio Prusiner (1998) relaciona argumentos a favor de esta hipótesis, que se recogen a continuación, algunos de los cuales serán comprendidos a partir de la información que se incorpora más adelante:

PrP^{Sc} y la infectividad scrapie, copurifican cuando se utilizan procedimientos bioquímicos e inmunológicos.

Las propiedades inusuales de PrP^{Sc} mimetizan las de los priones. Muchos de los procedimientos que modifican o hidrolizan PrP^{Sc}, inactivan los priones.

1. Los niveles de PrP^{Sc} son directamente proporcionales a los títulos de los priones. El PrP^{Sc} no desnaturalizado, no se separa de la infectividad.

2. No existen evidencias de la existencia de ácidos nucleicos ni de partículas semejantes a virus o de un genoma.

3. La acumulación de PrP^{Sc} se asocia, invariablemente, con la patología de las encefalopatías espongiiformes, incluyendo la presencia de placas amiloides.

4. Las mutaciones en el gen *PrP* se relacionan genéticamente con las enfermedades hereditarias por priones y causan formación de PrP^{Sc}.

5. La sobreexpresión de PrP^C incrementa la tasa de formación de PrP^{Sc}, lo cual acorta el periodo de incubación. El bloqueo de los genes *PrP* elimina los sustratos necesarios para la formación de PrP^{Sc} y previene, tanto las enfermedades priónicas, como la replicación del prión.

6. Las variaciones de especie en la secuencia de *PrP* son responsables, al menos en parte, de la barrera de especie que se observa cuando los priones pasan de un hospedador a otro

7. PrP^{Sc} se une, preferentemente, al PrP^C homólogo, dando lugar a la formación de PrP^{Sc} naciente y a la infectividad priónica.

8. Si se disponen genes *PrP* quiméricos o parcialmente delecionados, se observa que cambian la susceptibilidad a los priones de diferentes especies y que soportan la producción de priones artificiales con propiedades nuevas, que no se encuentran en la naturaleza.

9. La diversidad priónica tiene que ver con la conformación de PrP^{Sc}. Pueden generarse cepas por pase a través de hospedadores con diferentes genes PrP. Las cepas prión se mantienen por interacciones PrP^c/ PrP^{Sc}

10. Los priones humanos de ECJf y de IFF imparten diferentes propiedades a PrP quiméricos en ratones transgénicos, los cuales proporcionan un mecanismo para la propagación de cepas.

CARACTERES DE LOS PRIONES

MORFOLOGÍA ESTRUCTURA

Las fracciones microsómicas obtenidas de tejidos infectados, contienen numerosas vesículas de membrana en las que se localizan las partículas infecciosas PrP^{Sc}, submicroscópicas, que representan una forma polimérica que se obtiene después del tratamiento con proteinasa K y con detergentes. Tales partículas poliméricas poseen forma bacilar y se las ha denominado '*bacilo prion*' y resultan de la agregación de priones infecciosos. La mayoría de estos agregados poseen un tamaño uniforme, de unos 11 nm de diámetro y una longitud de 165 nm de media (desde 25 a 550 nm); al contrario que en el caso de los virus, que poseen un tamaño y estructura uniformes, los bacilos prión son irregulares y están compuestos de PrP 27-30. No se distinguen de los amiloides purificados; Unitariamente los bacilos son lisos, acintados, y en ocasiones, aparecen retorcidos. Otras veces aparentan amiloides purificados tanto estructural como histoquímicamente, constituyendo lo que se denomina 'fibrillas asociadas al *scrapie*' (SAF ó FAS). Placas amiloides y fibrillas asociadas al *scrapie*, son específicas de las encefalopatías espongiiformes y poseen interés diagnóstico.

En su estado normal, la molécula de PrP^c adopta una disposición enmadrada, plegada en múltiples hélices (espirales o cilíndricas) denominadas hélices α , que en número de 3-4, se disponen en el centro de la molécula, con un contenido minoritario de otras estructuras laminares, denominadas láminas β .

El número de hélices depende del método de estudio utilizado. Mediante estudios de modelaje molecular, aparecen 4 hélices protéicas que contienen 4 regiones de estructura

secundaria, denominadas H1, H2, H3 y H4. Mediante estudios de resonancia magnética nuclear, a partir de un PrP sintético, la región H1 (residuos 90-145, en los cuales los 113-128 están muy conservados y corresponden a una región transmembrana) no se dispone en hélice α

En la disposición espacial se observa, también un puente S=S que asienta en los residuos de cisteína (Cis-179 y Cis-214), una región hidrofóbica, conservada, y dos bucles o lazos (entre los aminoácidos 129 y 134, el primero, y entre el 159 y 165, el segundo). Cuando se produce la transformación a PrP^{Sc}, la molécula se estira y también lo hacen las hélices que pasan a disposición laminar (se mantienen dos hélices α) imponiendo, por tanto, su propia estructura β al conjunto de la molécula. En ella se siguen observando los dos lazos aludidos antes (Cohen y Prusiner, 1998; Donne *et al.*, 1997).

Mediante estudios de ultrafiltración se ha observado que los priones purificados pueden atravesar filtros de un diámetro promedio tan bajo como 20 a 100 nm, lo que sugiere un tamaño en el rango de muchos virus convencionales (Prusiner y McKinley, 1987; Prusiner *et al.*, 1998).

COMPOSICIÓN

PrP^c y PrP^{Sc} poseen un peso molecular aparente de 33-35 kDa en geles de SDS-poliacrilamida. Después del tratamiento con proteínasa K, PrP^{Sc} se acorta a un tamaño de 27-30 kDa, en tanto que PrP^c desaparece como consecuencia de la digestión. Se entiende, así, que en los primeros trabajos de purificación de la forma infecciosa de estos agentes, se definiese como una proteína de 27-30 kDa resistente a las proteasas.

Con carácter general el gen de PrP en los mamíferos, codifica una proteína de aproximadamente 250 aa (mediante secuenciación proteica y espectrofotometría de masas, se ha establecido para PrP^{Sc} de la EEB una secuencia de 256 o 264 aminoácidos, idéntica a la que se deduce de la secuencia del gen que codifica para ella), que contiene distintos dominios, incluyendo un péptido señal en posición N-terminal, una serie de 5-6 octapéptidos repetidos, ricos en prolina y glicina, un segmento hidrofóbico central, altamente conservado (aminoácidos 110/113 a 128) y una región C-terminal, también hidrofóbica, que constituye

una señal para la incorporación de un fragmento compuesto por glicosil -fosfatidil-inositol (GPI) que tiene a su cargo el anclaje a las membranas (Prusiner, 1982, 1984, 1995, 1998).

Después del procesado de los fragmentos N- y C- terminales, lo que sucede en el curso de su biología, tanto PrP^c como PrP^{Sc} se mantienen con 209 aminoácidos. En el caso de PrP^{Sc}, después tratamiento con proteinasa K, que produce una proteólisis limitada, aparece una cadena polipeptídica truncada con tan solo 142 aminoácidos.

La PrP es, realmente, una glucoproteína que contiene ácido siálico. PrP^c y PrP^{Sc} están glucosilados en dos residuos de asparragina, y mientras que el primero (PrP^c) permanece unido a la célula a través de un enlace de glicosil fosfatidil inositol (GPI), la isoforma patológica (PrP^{Sc}) se acumula intracelularmente en vesículas citoplasmáticas.

La PrP^{Sc}, tal como se obtiene del cerebro de los animales afectados, está agregada (polimerizada), es insoluble en los detergentes y no se evidencia a no ser mediante el uso de métodos estructurales de alta resolución.

LOCALIZACIÓN

La PrP^c se puede observar anclada en las membranas plasmáticas celulares, especialmente en las neuronas y la microglía, el auténtico sistema defensivo del cerebro y médula espinal, que se comporta como los macrófagos en otros lugares (Brown *et al.*, 1996). También se ha descrito en las células dendríticas, en las uniones neuromusculares, en varios tejidos periféricos y en los leucocitos. El mRNA del PrP se detecta primero en el cerebro de ratones y embriones de pollo, al comienzo de la embriogénesis, incrementándose sus niveles en dichas localizaciones, a medida que tiene lugar el desarrollo embrionario. En el SNC de los adultos, el PrP y su mRNA están ampliamente distribuidos, especialmente concentrados en la región neocortical y el hipocampo, en las células de Purkinje del cerebelo y en las neuronas motoras espinales. La PrP^c es un tipo de proteína muy conservada, como ya se ha señalado, pues se ha descrito en numerosas especies de mamíferos y aves (Krakauer, *et al.*, 1976; Rodríguez Ferri, 2001).

Por su parte, la PrP^{Sc}, se localiza en el cerebro, principalmente en el interior de las neuronas. Con carácter general debe afirmarse que no ha sido fácil llevar a cabo estudios que condujeran a aclarar estos extremos pues esta forma de proteína es escasamente

inmunógena, a menos que sea tratada con agentes desnaturalizantes. Estudios de inmunofluorescencia a partir de cultivos de células N2a infectadas sugieren que algunas moléculas, de algunos clones, de PrP^{Sc} se descubren en el aparato de Golgi. El M/E, tanto a partir de cultivos de células N2a como de estudios de tejido cerebral también localiza PrP^{Sc} a nivel endosómico y lisosómico. A ello se une, el que PrP^{Sc}, tanto de origen infeccioso como mutante (enfermedades hereditarias humanas), puede demostrarse mediante tinción inmune con oro en la superficie celular. Así pues, la conclusión no puede ser otra que PrP^{Sc} está distribuido en distintas localizaciones dentro de las células infectadas, pero es preciso ratificar y cuantificar en el futuro estas estimaciones, una vez que se disponga de mejores métodos de detección que los que se dispone en la actualidad (Harris, 1999). En el cerebro, PrP^{Sc} se localiza en el tálamo e hipotálamo, según se desprende del uso de ratones transgénicos.

BIOENSAYOS Y OTROS MODELOS DE ESTUDIO

Bioensayos.- Todos los estudios con estos agentes se han llevado a cabo, hasta fecha reciente, utilizando animales de laboratorio en los que la medida de la infectividad se ejecuta mediante las pruebas del intervalo del periodo de incubación o mediante la titulación al límite; en cualquier caso, un método y otro son muy lentos, pues requieren esperar la aparición de los síntomas nerviosos después de un periodo de incubación prolongado cuya duración depende la especie animal, la vía de inoculación y la dosis inoculada. Los animales preferidos para estos ensayos han sido los cricetos *ohamsters* y los ratones, especialmente los primeros, porque el periodo de incubación es más corto (dos veces más) y además su cerebro proporciona títulos de infectividad más altos (10 a 100 veces más altos).

La titulación al límite se lleva a cabo diluyendo de forma decimal la muestra que contiene la actividad infectante y de cada dilución se inoculan lotes de 4 a 6 animales, por vía intracerebral. Se utilizan ratones y ha de esperarse 10-12 meses (se examinan a los 3 meses y después semanalmente durante los siguientes 9 meses). Se da como título la dilución más alta en la que se observan signos neurológicos de encefalopatía espongiiforme. Los animales mueren, típicamente, entre 4 y 6 semanas después de la aparición de los síntomas (el tiempo total es de 360 días, aproximadamente). En ocasiones se confirma el resultado mediante histología o inmunohistoquímica.

El método del intervalo del tiempo de incubación reduce el número de animales, el tiempo necesario y otros posibles errores. Este tipo de ensayo, que se lleva a cabo en criceto mide, por un lado, el tiempo que transcurre desde la inoculación a la aparición de la enfermedad y, por otro, el tiempo desde la inoculación hasta que sobreviene la muerte. La diferencia entre ambos es la duración del proceso clínico. Se prepara una dilución decimal de la muestra y se inoculan intracerebralmente un lote de 4 animales lactantes. Los animales muestran signos neurológicos a partir de las 7 semanas después de la inoculación. La muerte se produce entre los 20 y 22 días posteriores (el tiempo total es, por tanto, de 60-70 días). Para llevar a cabo la determinación, se construye una curva de calibración.

Los títulos del material infeccioso se calculan basándose en la dilución más alta en la que mueren aproximadamente el 50% de los animales. Para definir el título se utilizan la DL₅₀ (dosis letal 50) por gramo, que en este caso particular (dado lo inevitable de la muerte postinfección), coincide con la DI₅₀ (dosis infecciosa 50) por gramo. Representa la dosis necesaria para matar al 50% de los animales.

Modelos celulares.- El análisis experimental de las enfermedades víricas convencionales depende de la capacidad del agente infeccioso para crecer en cultivos celulares. En el caso de las enfermedades priónicas se han introducido, en los últimos años, modelos celulares basados en líneas de células que, después de infectadas, producen PrP^{Sc}.

Existen varios tipos de células que, se piensa, producen PrP^{Sc} después de la infección por priones *in vivo*, incluyendo neuronas, astrocitos y células linforreticulares, pero solo algunas líneas derivadas de éstas, parecen ser susceptibles a la infección con PrP^{Sc} *in vitro* (Bosque y Prusiner, 2000; Chiesa *et al.*, 2000). Se incluyen las células N2a de neuroblastoma de ratón, las células PC12 de pheocromocitoma de rata, las células HaB de cerebro de *hamster* transformadas de forma espontánea y las células GT1, que son neuronas hipotalámicas transformadas. Después de infectadas, estas células producen de forma continua bajos niveles de PrP^{Sc} que se reconocen por las características ya conocidas de resistencia e insolubilidad, así como por su capacidad infectante en bioensayos animales. Sorprendentemente no existen prácticamente cambios que identifiquen la infección, excepto el caso de las células GT1, que parecen sufrir apoptosis (Schatzl *et al.*, 1997.) y las N2a, en las que se han descrito alteraciones en la respuesta mediada por bradicinina y en la fluidez

de la membrana (Chiesa *et al.*, 2000; Nishida *et al.*, 2000). Los cultivos celulares infectados por *scrapie* proporcionan un buen modelo de formas infecciosas priónicas.

En el caso de las formas familiares (hereditarias) también se dispone actualmente de células CHO (células de ovario de hamster chino), células PC12, N2a, M17 (neuroblastoma humano) y 3T3 (fibroblastos transformados de ratón).

Es previsible que a corto plazo se desarrollen modelos de ensayo celulares, efectivos y normalizados, que sustituyan, con ventaja, a los animales. En este sentido, Nishida *et al.*, en 2000, han desarrollado una línea celular de neuroblastoma murino que sobreexpresa priones normales en grandes cantidades y que resulta suficientemente sensible a la infección por varias cepas de *scrapie* (Chandler, 139 A y 22L), pero no a otras (87V y 22 A) y, también, Bosque y Prusiner (2000) han desarrollado un bioensayo en cultivo celular para priones, mediante la subclonación de una selección de clones que producían grandes cantidades de PrP^{Sc}, con una sensibilidad diferente según la cepa prión utilizada (100 veces más sensible a la cepa RML que a la cepa ME7).

BIOLOGÍA Y FUNCIÓN

Igual que ocurre con otras proteínas de membrana, PrP^c se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso (ER) y, en su camino hacia la superficie celular, se traslada al aparato de Golgi. Durante su biosíntesis, PrP^c es objeto de varias clases de modificaciones post-traduccionales en las que se incluye la separación del péptido señal N-terminal, la incorporación (a nivel del retículo endoplásmico) de cadenas de un oligosacárido que lleva unido nitrógeno y que posee un alto contenido en manosa, la causa de su sensibilidad a la digestión por una endoglucosidasa H, la formación de los puentes S=S y la adición del GPI al extremo C-terminal de la cadena. En el aparato de Golgi se produce una modificación de las cadenas del oligosacárido originando cadenas más complejas, con ácido siálico y, ahora, resistentes a la endoglucosidasa. El ácido siálico también se añade al GPI, en el aparato de Golgi.

El anclaje de GPI, que se añade en el retículo endoplásmico después de haberse separado el fragmento hidrofóbico C-terminal, posee una estructura interna común con la de otras proteínas unidas a glucolípidos y consiste en un residuo de etanol-amina unido al aminoácido C-terminal, 3 residuos de manosa, 1 residuo de glucosamina no acetilada y 1

molécula de fosfatidil-inositol (PI) que está destinado a disponerse en la parte externa de la membrana lipídica

Los GPI, tanto en el caso de PrP^c como en PrP^{Sc}, son estructuras singulares, pues sus núcleos están modificados por la unión de residuos de ácido siálico. Algunos datos recientes parecen indicar que las cadenas del oligosacárido y el GPI de ambas isoformas priónicas no presentan diferencias.

El PrP^c posee una tendencia intrínseca a adoptar algunas características semejantes a las que manifiesta PrP^{Sc} durante su maduración conformacional y la unión de cadenas de N-glucano (los oligosacáridos de manosa, nitrogenados) protegen frente a este cambio. Este fenómeno explicaría la observación de que diferentes cepas de priones manifiestan, a veces, distintos modelos de glucosilación.

Separación post-traduccional: Los resultados de las investigaciones desarrolladas por diversos autores sobre líneas celulares transfectadas, así como sobre tejido cerebral y con líquido cerebroespinal, han puesto de manifiesto que PrP^c sufre dos separaciones post-traduccionales como parte normal de su metabolismo. La primera tiene lugar dentro del GPI (probablemente a consecuencia de una fosfolipasa de la superficie celular) y origina la liberación de la cadena polipeptídica en el medio extracelular. La segunda es de carácter proteolítico y ocurre dentro de un pequeño fragmento de 16 aminoácidos hidrofóbicos (desde el aminoácido 110), completamente conservados en todas las especies de PrP clonadas hasta la fecha. Según Harris (1999) esta separación tiene lugar en un compartimento endocítico de la célula, mientras que otros autores sostienen que se produce a nivel de la membrana plasmática.

Ambas roturas y las consiguientes separaciones se producen lentamente, en comparación con la vida media de la proteína y su significado fisiológico no se conoce. A este respecto se sugiere que los fragmentos N-terminales, de 10 kDa, que se liberan como consecuencia de la segunda de estas separaciones, podrían servir como un ligando biológicamente activo. También se especula que, si se admite que la PrP^c funciona como un receptor de la superficie celular, las roturas y separaciones consiguientes, podrían representar mecanismos de regulación.

Circulación: Debido a que PrP^c se une a la membrana exclusivamente por un anclaje GPI, el tratamiento con sustancias como fosfolipasa C, que es específica de fosfatidil inositol (PI) (PI-PLC) rompe la porción diacil glicerol del anclaje y permite su liberación.

Los estudios con líneas celulares transfectadas que expresan la proteína han permitido avances interesantes en el conocimiento de la circulación subcelular de PrP^c. Harris *et al.* (1991), que trabajan con la versión aviar de PrP^{Sc}, han demostrado que éste no permanece sobre la superficie celular después de su expresión, sino que podrían existir a modo de ciclos alternativos en los que la proteína o bien aparece sobre la membrana o bien lo hace en un compartimento endocítico. En cultivos celulares de neuroblastoma, las moléculas de PrP completan ciclos a través de la célula con tiempos de tránsito de alrededor de 1 hora y durante cada uno de estos episodios, se fragmentan proteolíticamente entre el 1 y el 5% de las moléculas (Lehmann *et al.*, 1999).

Esta ruta de reciclaje endocítico posee dos tipos de interés distintos. Por un lado, podría tratarse de la vía a lo largo de la cual se suceden ciertas etapas de la conversión de PrP^c en PrP^{Sc}, pues por ejemplo, Harris *et al.*, (1991) han visto que los glucanos sulfatados, que son potentes agentes terapéuticos anti-*scrapie*, estimulan de forma espectacular la endocitosis de PrP^c, dirigiendo algunas de las moléculas a los últimos endosomas y/o lisosomas, en los que se especula que pueda ser ineficaz la conversión a PrP^{Sc}.

Por otro lado, la existencia de una vía de reciclado sugiere que una posible función fisiológica de la PrP^c podría ser la de servir como receptor para la captación de un ligando extracelular, como sucede por ejemplo, en el caso de la transferrina o de las lipoproteínas de baja densidad (Lehmann *et al.*, 1999). El ion cobre sería, al respecto, un candidato muy interesante como ligando, pues como ya se señaló, hay varias evidencias a favor de la conexión entre PrP^c y el metabolismo del cobre. Pauly y Harris (1998) han sugerido que PrP^c une iones de Cu en la superficie celular y después los liberan a un compartimento endocítico al disociarse de PrP^c. Allí son transferidos a otras proteínas portadoras de cobre, que trasladan los iones al interior del citoplasma. PrP^c podría, entonces, volver a la superficie celular y comenzar, de nuevo, otro ciclo. En relación con esta propuesta se ha visto (Pauly y Harris, 1998) que los iones de Cu a concentraciones fisiológicamente relevantes, estimulan la endocitosis de PrP^c desde la superficie de la célula, de forma rápida y reversible.

Depresiones de clatrina y otras. La membrana plasmática celular, en zonas concretas, adopta la disposición de depresiones o concavidades bien definidas que, por su parte interior, están recubiertas de clatrina, un tipo de proteína oligomérica dispuesta estructuralmente en forma rejilla que primero invagina y luego comprime la membrana, dando origen a una vesícula que después puede fundirse con otros orgánulos celulares. En el caso de la transferrina y otros receptores lipoprotéicos de baja densidad, su endocitosis tiene lugar, precisamente, a través de estas depresiones. Shyng *et al.*, (1994) han observado que se utiliza un sistema idéntico para endocitar PrP, conclusión a la que llegaron después de numerosos estudios al microscopio electrónico utilizando como modelo PrP^c aviar. En este proceso, la mitad N-terminal de la cadena polipeptídica de PrP^c resulta clave para la eficacia de la endocitosis, pues pérdidas o deleciones en la misma disminuyen la concentración en las depresiones y su internalización. En cualquier caso, la implicación de las depresiones recubiertas de clatrina en la endocitosis de PrP^c, resulta sorprendente, toda vez que este tipo de proteínas, que disponen de un ligando-anclaje de GPI carecen de dominio citoplasmático.

Para explicar la asociación de PrP^c con las depresiones recubiertas de clatrina, se ha propuesto la existencia de un receptor de PrP^c, por ejemplo, una proteína transmembrana, con una señal de localización en su dominio citoplasmático, mientras que sus dominios extracelulares ejecutarían la unión a la porción N-terminal de PrP^c. La unión de iones de Cu, podría exaltar la afinidad de PrP^c por este receptor, que todavía no se ha descubierto, pero cuya identificación posee, en la actualidad, gran interés, puesto que proporcionaría las claves necesarias para comprender la función normal de PrP^c y, además, permitiría diseñar estrategias terapéuticas capaces de bloquear la captación endocítica de PrP^c inhibiendo, consecuentemente, la replicación del príon infeccioso PrP^{Sc} (Vieshl *et al.*, 1999).

Tal tipo de receptor podría estar implicado, también, en la conversión de PrP^c a PrP^{Sc}, o en la captación inicial de partículas que contienen PrP^{Sc} en el interior de las células. Se ha comenzado a investigar sobre un receptor para la PrP^c, identificando los sitios de unión de la superficie celular para proteínas bacterianas de fusión radioyodadas, que incorporan segmentos de la PrP. Hasta ahora se han detectado sitios de unión específicos y saturables sobre la superficie de células cultivadas que tienen una afinidad de 70 a 240 nM, con aproximadamente 1 millón de sitios por célula.

Alternativamente se ha especulado que la presencia de GPI podría condicionar también otra forma de internalización a través de otro tipo de depresiones-invaginaciones (caveolas), en este caso recubiertas de una proteína diferente, denominada caveolina (Anderson, 1993) particularmente abundante, por ejemplo, en los fibroblastos, células de la musculatura lisa y células endoteliales, pero que no se dan en el caso de la internalización de PrP^c en las neuronas (Shyng *et al.*, 1994).

Gorodinsky y Harris (1995) han observado que cuando se extraen las células con Tritón X-100 a 4°C, se recupera PrP^c, conjuntamente con otras proteínas que llevan anclajes de GPI, en grandes complejos resistentes a los detergentes los cuales contienen, además, colesterol, esfingolípidos y moléculas señal, como la tirosin-quinasa y subunidades de proteína G. Estos complejos, se ha propuesto, pueden representar el equivalente bioquímico de las caveolas. Aunque no se excluye que sean, simplemente, artefactos, tampoco se excluye que se correspondan con microdominios de la membrana o transportadores ('rafts'), los cuales se implicarían en la señalización y distribución de proteínas transmembrana (Collinge *et al.*, 1997). Como señala Harris (1998), sería fascinante si la PrP estuviera implicada en procesos de este tipo, en las neuronas.

La cinética de la síntesis de PrP^c y PrP^{Sc} estudiada en cultivos celulares ha permitido postular que PrP^{Sc} se genera a partir de PrP^c en un proceso post-traducciona (Borchelt, *et al.*, 1990; Borchelt *et al.*, 1992; Caughey *et al.*, 1989; Caughey y Raymond, 1991). Tal conversión implica una reducción de las estructuras denominadas hélices α y, paralelamente, un incremento de las estructuras denominadas láminas β . Fuera de esto, no se observan diferencias químicas entre las dos isoformas.

Unión a la membrana No está claro el mecanismo preciso de unión. Los análisis químicos demuestran que tanto PrP^{Sc} como PrP^c poseen un anclaje GPI en el extremo C-terminal. Sin embargo, PrP^{Sc} no se libera desde las membranas después del tratamiento con PI-PLC, lo que sugiere que PrP^{Sc} está asociado a la membrana de forma diferente a como lo hace PrP^c, aunque por el momento no se conoce el modo.

Datos recientes han sugerido que la resistencia a la liberación mediada por PI-PLC se debe a que los anclajes de GPI se hacen químicamente inaccesibles a la fosfolipasa como una consecuencia, en parte, de su conversión al estado PrP^{S^c}.

Así pues, la resistencia a PI-PLC sería una propiedad operacional, análoga a la resistencia a las proteasas, reflejando una alteración en la estructura de PrP, que tiene que ver con la conversión a PrP^{S^c}. La razón puede estar en un cambio en la conformación de la cadena polipeptídica, pero también puede estar relacionada con la agregación o polimerización de la proteína.

Cinética de la producción: Ha sido estudiada tanto en cultivos de células N2a como HaB infectadas con *scrapie*. También se ha estudiado en células CHO que expresan mutantes PrPs.

Las PrP^{S^c} solo se generan en el periodo que sigue a la traducción del mRNA del PrP^c y su acumulación media máxima requiere varias horas, lo que está de acuerdo con la hipótesis de que la transformación es post-traducciona. Una vez formado PrP^{S^c}, durante un periodo de 24-48 horas, aparenta ser metabólicamente estable (PrP^c solo posee una vida media de 4-6 horas).

Solo una minoría de PrP^c se convierte en PrP^{S^c} en las células infectadas, mientras que el resto es degradado por vías semejantes a las que se encuentran en las células sin infectar que, aunque no se han establecido con claridad, pueden implicar compartimentos acídicos, con endosomas y lisosomas.

Utilizando células CHO transfectadas, midiendo progresivamente las 3 propiedades clásicas que caracterizan a PrP^{S^c} (resistencia a PI-PLC, resistencia a proteinasa K e insolubilidad en detergentes), se han identificado 3 fases bioquímicas intermedias en la conversión del mutante PrPs a PrP^{S^c}.

Los primeros cambios incluían la adquisición de resistencia a PI-PLC. La segunda fase es la adquisición del carácter insoluble a los detergentes, que presumiblemente refleja la agregación de las moléculas de PrP. Finalmente, en tercer lugar se adquiere resistencia a

las proteasas, que no es máxima hasta varias horas después del estímulo. Estas características reflejan la maduración de los priones, una vez transformados.

Lugar de formación subcelular de PrP^{Sc}: Existen pocos datos acerca de cómo el PrP^{Sc} es tomado por las células, al principio de la infección. Si la captación tuviera lugar a través de un mecanismo endocítico, PrP^{Sc} podría interactuar con PrP^C bien sobre la membrana o en endosomas, y evidentemente, los acontecimientos clave en la conversión a buen seguro que tendrían lugar en esas localizaciones. De hecho, varios datos parecen sugerir que, en las células N2a y Hab infectadas con *scrapie*, está implicada una vía endocítica en la generación de PrP^{Sc}; por un lado, esto está de acuerdo con la localización de, al menos algunas moléculas, en los endosomas y lisosomas.

Algunos estudios recientes sugieren que determinados subdominios de la membrana, resistentes a los detergentes, con carácter transportador también parecen estar implicados en la formación de PrP^{Sc}. Según esta hipótesis, tanto PrP^{Sc} como PrP^C estarían situados en dominios transportadores aislados bioquímicamente. La deplección farmacológica, que se sabe rompe estos dominios, inhibe la formación de PrP^{Sc}, lo que viene a confirmar estos hechos.

Las fases individuales de la formación de PrP^{Sc} parece que pueden tener lugar en, al menos, dos localizaciones distintas, según se desprende de estudios con mutantes PrPs generados en células CHO. Por un lado, la adquisición de la resistencia a PI-PLC, que es la más precoz, debe tener lugar en el retículo endoplásmico. La resistencia a las proteasas y la insolubilidad a los detergentes, que se adquieren más tarde, deben tener lugar después de la llegada de la proteína a la superficie celular, sobre la propia membrana o en compartimentos endocíticos. Parece que en la adquisición de ambos caracteres pueden intervenir los dominios transmembrana. La extrapolación de estos datos a las células infectadas con PrP^{Sc} supondría que la generación de PrP^{Sc} comenzaría en el retículo endoplásmico y que sería necesario que el PrP^{Sc} externo tuviese acceso al lumen del retículo endoplásmico para que pudiera interactuar con el PrP^C recién sintetizado. También parece razonable pensar que los chaperones del retículo endoplásmico (Edenhofer *et al.*, 1996; Liautard, 1999), a los que se ha denominado también proteína X, intervendrían en la regulación. Esta proteína, que ha sido denominada de este modo en razón del desconocimiento que se tiene sobre ella, está centrando en la actualidad, gran número de

investigaciones, pues podría catalizar la clave de eventuales recursos terapéuticos, al bloquear la transformación de PrP^c en PrP^{Sc}; Demostrar esto, sin embargo, requiere de nuevas y complicadas investigaciones (Perrier *et al.*, 2000). En el campo de la inhibición de este tipo de proteínas se enmarcan, también, las observaciones realizadas respecto de la actuación de antibióticos poliénicos, como es el caso del antifúngico amfotericina B (Adjou *et al.*, 1996; Mangé *et al.*, 2000).

División post-traducional del PrP^{Sc}. El PrP^{Sc} en cultivos celulares y cerebro, sufre una división proteolítica, que separa un fragmento en el extremo N-terminal de la molécula. La rotura tiene lugar en un sitio (C) distinto del que divide a PrP^c (B), coincidente con el lugar de ataque de la proteinasa K para originar PrP 27-30. En el caso de PrP^c, el punto de rotura coincide en una región amiloidogénica y neurotóxica.

En el caso de PrP^{Sc}, la rotura se produce en los endosomas o lisosomas, compartimentos que pueden jugar un papel clave en la generación de esta isoforma, como ya se ha comentado.

Función: La PrP es una proteína altamente conservada entre los mamíferos y ha sido, también, identificada en los marsupiales y en las aves (Windl *et al.*, 1995; Harris *et al.*, 1993), pudiendo estar presente en todos los vertebrados. Parece que se expresa durante los primeros tiempos de la embriogénesis y se encuentra en muchos tejidos de los individuos adultos, aunque los niveles más altos de expresión se observan en el SNC, particularmente asociado con las membranas sinápticas. También aparece expresada, ampliamente, en células del sistema inmune, como ya hemos señalado.

La función normal del PrP^c no se conoce, aunque su localización en la superficie celular podría estar relacionada con funciones de adherencia celular y de reconocimiento o de señalamiento, bien mediante ligandos o mediante señales transmembrana (Gasset y Westway, 2000).

A estos hechos hay que unir, un cierto papel en la captación, transporte y metabolismo (homeostasis) del cobre intracelular (Gasset y Westaway, 2000; Harris, 1999) puesto que PrP^c purificada une cobre a través de la región peptídica repetida, a la vez que los ratones PrP-nulos (con el gen bloqueado o suprimido) presentan un contenido reducido de este

elemento asociado a las membranas y una actividad muy disminuida de la superóxido dismutasa de Cobre y Zinc (SOD Cu-Zn). La hipótesis es que PrP^c podría servir como un receptor endocítico para la unión del Cu procedente del medio exterior (Viesl *et al.*, 1999; Waggoner *et al.*, 2000) (también se ha sugerido que PrP puede unir manganeso, lo que supondría que en presencia de bajas concentraciones de cobre y altas concentraciones de manganeso se produciría la conversión de PrP^c a PrP^{Sc}, o mejor, a una forma resistente a las proteasas que podría coincidir con la PrP^{Sc}).

Por otra parte, en experimentos con ratones PrP-nulos se ha observado, también, que no desarrollan defectos evidentes, ni anatómicos ni otros relacionados con el crecimiento y desarrollo, aunque en algunos estudios si que se han descrito anomalías estructurales y electrofisiológicas en el hipocampo, con pérdida de células de Purkinje, alteraciones en los ritmos circadiano y del patrón del sueño y, cambios en la capacidad de aprendizaje y de la memoria. El problema que plantean estos estudios es que no son repetitivos y que no han sido ratificados por otros investigadores, lo que se interpreta en razón de posibles diferencias entre líneas genéticas de los animales utilizados en los estudios, que repercuten en diferencias en la región del gen PrP objeto del bloqueo.

Finalmente como quiera que puede demostrarse, a partir de informaciones bioquímicas, que la PrP^c es transportada por los axones hasta las terminaciones nerviosas y que, mediante estudios inmunocitoquímicos, ha podido establecerse también, su concentración primaria en las sinapsis (en el bulbo olfatorio, estructuras límbicas y otras), no es arriesgado pensar que los priones desempeñen algún tipo de papel en la transmisión del impulso nervioso.

En cualquier caso, es indudable que cuando se comprenda suficientemente el conocimiento de la función fisiológica de PrP^c ello ayudará a comprender la patogénesis de las EETs pues, independientemente de la acción directa de las isoformas patológicas infecciosas, la función normal deja de realizarse al producirse la sustitución por la PrP^{Sc}.

En el caso de la PrP^{Sc} parece que la presión ejercida por el acúmulo de estas moléculas en lisosomas secundarios, termina por producir la degeneración de la neurona por un mecanismo desconocido, aunque puede deberse, simplemente a un efecto físico ligado al depósito de placas amiloides y fibrillas (FAS), aunque al menos en el caso de éstas

últimas su inconsistencia y la posibilidad de que se deban más a un tratamiento de las muestras que al efecto en sí de los cambios patológicos, induce en la actualidad suficientes dudas (Prusiner, 1998).

REPLICACIÓN

En principio, se considera que PrP^{Sc} actúa como un molde que promueve la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} y que esta conversión implica, solamente, un cambio de forma. A este respecto, se han postulado dos teorías para explicar el mecanismo de formación de PrP^{Sc} nuevas; el primero, denominado del heterodímero, señala que una PrP^{Sc} (monómero) se combina con una PrP^C (monómero) formando un heterodímero en el que después, PrP^C se convierte en PrP^{Sc} y más tarde los dos nuevos monómeros PrP^{Sc} se disocian formando monómeros activos que inician un nuevo ciclo combinándose con otras moléculas de PrP^C. El modelo de polimerización nucleada establece que la actividad conversora es un agregado de PrP^{Sc} cuyo crecimiento se produce por incorporación de PrP^C en uno o ambos extremos, los cuales como en el caso anterior, después son objeto de un cambio conformacional (Prusiner *et al*, 1984).

Todas las evidencias indican que la conversión de PrP^C en PrP^{Sc} es post-traducciona l y conformacional, y que las dos isoformas poseen la misma secuencia de aminoácidos. Los cambios conformacionales implican un incremento sustancial en la cantidad de láminas β , con el consiguiente decremento en la cantidad de hélices α . Mediante análisis físicos complejos (estudios de dicroísmo circular y espectroscopía de infrarrojos) se ha establecido que la PrP^C contiene aproximadamente un 42% de hélices α y un 3% de láminas β , que comparados con el 30% de hélices α y el 43% de láminas β que se señalan para la PrP^{Sc} permiten estimar, para el conjunto, que la primera posee estructura helicoidal y la segunda laminar. Basándose en el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear de PrP recombinante producido en bacterias, se ha establecido una estructura terciaria de PrP^C que incluye una larga y flexible cola N-terminal (que comprende los residuos 23 a 121), 3 hélices α y 2 pequeñas hebras antiparalelas β , que flanquean a la primera de las hélices α (Cohen y Prusiner, 1998; Donne *et al.*, 1991).

El modelo que se ha propuesto para la estructura terciaria de la PrP^{Sc} incluye cambios en la mitad N- con el plegamiento de una porción de la cola, desde los residuos 90 al 121 (y

posiblemente parte de la primera hélice α) en láminas β . Cuando se consiga obtener una estructura completa PrP^{Sc} (habitualmente por técnicas espectroscópicas y cristalográficas) y se pueda especificar atómicamente el cómo se produce esta estructura desde la conformación PrP^c se habrá avanzado en la comprensión del sistema de replicación (Cohen y Prusiner, 1998; Donne *et al.*, 1991). Se tiene la idea de que, durante la infección priónica tiene lugar una interacción física altamente específica entre PrP^c y PrP^{Sc}, conclusión basada en que los ratones que no sintetizan PrP^c a causa de que su gen endógeno ha sido eliminado, son completamente resistentes a la infección priónica; además, la expresión de formas de ingeniería genética de PrP en ratones transgénicos y en cultivos celulares, altera profundamente su susceptibilidad a la infección priónica. Así, por ejemplo, los ratones no son normalmente susceptibles a los priones derivados de hamster, pero la expresión de un transgen PrP de hamster en los ratones, les vuelve susceptibles a la infección.

Estudios adicionales han proporcionado evidencias sobre qué partes del sustrato PrP^c son críticas para la interacción de PrP^{Sc}. Dentro de la región central de la proteína, el grado de homología de los aminoácidos entre el sustrato de PrP^{Sc} infeccioso y PrP^c, influye profundamente en la eficiencia del proceso de conversión, de tal modo que la falta de correspondencia de un solo residuo (un solo aminoácido) puede impedir la formación de PrP^{Sc}. Además, PrP no homólogos pueden interferir con la conversión de PrP homólogo en células que expresan ambas proteínas. Así pues, la exquisita especificidad molecular que sugieren estos experimentos parece que es la razón fundamental de la fuerte barrera frente a la transmisión interespecífica de los priones.

Por tanto, la formación de PrP^{Sc} se inicia por la presencia de PrP^{Sc} extracelular que interactúa con el PrP^c de la superficie celular, posiblemente mediante estructuras resistentes a los detergentes, que catalizan la conversión, la cual también puede tener lugar después de la compresión de proteínas en un compartimento endosómico. Una vez formados, algunos PrP^{Sc} se acumulan en lisosomas, aunque también pueden hacerlo en otras localizaciones.

En encefalopatías espongiiformes no infecciosas, mutantes de PrP^c se convierten, de forma espontánea, en PrP^{Sc} a través de una serie de intermediarios bioquímicos, el primero de los cuales es una forma resistente a PI-PLC que se genera en el retículo endoplásmico. Después se liberan moléculas de mutantes de PrP a la superficie (o sin necesidad de ello,

también en organelas endocíticas), donde se hacen insolubles a los detergentes y, después, resistentes a las proteasas (Harris, 1999).

ESTABILIDAD, RESISTENCIA E INACTIVACIÓN

Radiaciones.- Antes de especularse, siquiera, con la naturaleza proteica de los agentes que causan las EET siempre llamaba la atención que la infectividad de los preparados de cerebro de ovejas con *scrapie*, resultaba particularmente resistentes a las radiaciones, tanto a las UV como a las ionizantes.

Diversos autores han descrito la diferencia de comportamiento del agente del *scrapie* respecto de los virus ante las radiaciones, como una cuestión que justifica la diferencia entre ambos. Bellinger-Kawahara *et al.* (1987) estudiaron, la inactivación de los priones del *scrapie*, mediante la irradiación con luz UV de 254 nm de preparaciones purificadas sobre hielo con dosis que llegaron hasta los 120.000 J/m². En las condiciones de los experimentos, una dosis de 10 J/m² formaba dos dímeros de timina por cada $5'1 \times 10^6$ daltons de DNA de células eucariotas. Para determinar su efecto por comparación, se estudiaron distintos controles, incluyendo un virus filamentoso (el bacteriófago M13), viroides (el viroide que causa el tubérculo fusiforme de la patata) y una enzima (la ribonucleasa A). Se observó que el comportamiento de los priones caía dentro del rango de las proteínas puras y respecto de los controles se demostró su mayor resistencia. Otros controles como el virus polyoma resulta 200 veces más sensible y los retrovirus murinos, 40 veces más. Todo ello sugiere la ausencia de cualquier tipo de ácido nucleico, al menos de cierto tamaño, aunque no pueda excluirse la posibilidad de que exista un pequeño polinucleótido de tamaño realmente muy pequeño, en el improbable caso de que tal fuera una realidad (Bellinger -Kawara *et al.*,1987).

También se han llevado a cabo estudios con radiaciones ionizantes, con idéntico comportamiento comparado con virus animales, bacteriófagos y viroides. Gibbs *et al.* (1978) comprobaron que el título de diversas preparaciones de kuru, ECJ y *scrapie* solamente se reducía 10^{-1} del valor de partida, o incluso menos, después de la irradiación con dosis tan altas como 50 kGy de rayos γ y, entre 10^1 y 10^3 , o menos, después de la irradiación con 200 kGy.

Calor.- El calor directo de la llama, el calor seco o el calor húmedo (inicialmente del agua hirviendo) han sido utilizados con propósitos de esterilización o desinfección desde las épocas más remotas. El calor húmedo, en particular, constituye un excelente agente de esterilización, por su elevado nivel de calor latente o valor térmico, se trate de bacterias, hongos o virus, siendo los esporos bacterianos los más resistentes; la mayoría de las células vegetativas bacterianas, los hongos o los virus se eliminan sin dificultad a partir de los 80°C durante 30 minutos o menos, según el tipo de microorganismo presente, mientras que en el caso de los esporos son necesarios tiempos de 15-20 minutos a 121°C para garantizar su inactivación (Prescott *et al.*, 1999). Con carácter general, el calor húmedo degrada los ácidos nucleicos y desnaturaliza proteínas y enzimas, mientras que el calor seco actúa fundamentalmente oxidando los constituyentes celulares y desnaturalizando las proteínas; en cualquier caso, su poder de penetración y calor latente es inferior al del calor húmedo.

La esterilización por calor húmedo puede llevarse a cabo utilizando diferentes tipos o sistemas de autoclaves con los que se han conseguido, también, resultados diversos. Los autoclaves de carga porosa (*porous load autoclaving*) fueron utilizados por Kimberling *et al.*, (1983) para el tratamiento de macerados de pequeños fragmentos (50 mg) de tejido infeccioso de animales inoculados con las cepas 22 A y 139 A de *scrapie*, consiguiendo la inactivación total después de la exposición a 136°C durante 4 minutos, sobre lo que se recomendaron temperaturas de 134-138°C en un ciclo de 18 minutos o en seis ciclos de 3 minutos (DHSS, 1984) para el tratamiento de material infectado con ECJ. Sin embargo, otros autores han documentado restos de actividad después de tratamientos de 134°C durante 1 hora (Taylor *et al.*, 1994). Para aclarar la causa de estos resultados contradictorios, se llevaron a cabo nuevos experimentos observándose que la diferencia de comportamiento tenía que ver con el diferente tamaño de los fragmentos de cerebro del macerado. En el primer estudio estos eran pequeños con el resultado de inactivación completa, mientras que en los estudios en que permanecía actividad residual después del tratamiento, el tamaño de los fragmentos de tejido cerebral era, prácticamente, 7 veces mayor (340 mg). El cambio en el tamaño se había propuesto, en primer lugar, en base a la observación de que el tratamiento a 134-138°C de muestras del mismo tamaño de tejido infectivo intacto (no macerado) habían terminado en inactivación total (Taylor, 1986, 1996; Taylor y McConnell, 1988) y a que ese tamaño, más grande, representaba mejor las masas

de tejidos de ETTs que podían requerir tratamiento en autoclave en actuaciones de salud pública.

Para comprobar la causa de este diferente comportamiento se llevaron a cabo nuevos experimentos con ciclos de 9 a 60 minutos a 134, 136 y 138°C, utilizando macerados de fragmentos de cerebro de un tamaño de 50 ó 375 mg y en el estudio se utilizaron 3 cepas de priones certificadas en su termorresistencia, dos de ellas de *scrapie* (cepas 22 A y 263 K) y una de EEB (cepa 301 V) (Demaimay *et al.*, 1999; Hunter y Millson, 1964; Taylor, 1999). Como resultado de estos estudios pudo comprobarse que cuando se utilizaban fragmentos grandes se producía un incremento de la termoestabilidad a medida que se aumentaba la temperatura de tratamiento (Taylor *et al.*, 1999) y la causa se explica porque la maceración en esas condiciones origina la distribución de una película persistente del material orgánico que queda pegada a las paredes de vidrio o metálicas del recipiente, cuando éste se mueve y luego se deseca, antes del tratamiento térmico en el autoclave. Parece que durante el tratamiento en el autoclave la película de material desecado sufre un calentamiento muy rápido que produce una fijación, también muy rápida, de la PrP^{Sc}, que incrementa su resistencia al calor. Este tipo de protección se ha comprobado también, en la fijación que tiene lugar durante la inactivación de los poliovirus con formol (Gard y Maaloe, 1959) y, por tanto, cabe pensar, de forma semejante a lo observado con estos virus, que el tratamiento del material infectivo del *scrapie* con etanol o con formol (Taylor y McConnell, 1988), produciría una fijación protéica que exaltaría considerablemente, también, su termoestabilidad.

Cuando el agente del *scrapie* se inactiva completamente como consecuencia del tratamiento en autoclave, se observa que el proceso de destrucción tiene lugar de una forma exponencial con una tasa de muerte constante (Rohwer, *cit.*, por Taylor -1999-). Por el contrario, cuando el tratamiento térmico solo consigue la inactivación parcial, la declinación inicial va seguida de una estabilización de la curva que representa la tasa de muerte, que persiste a lo largo del tiempo. En este sentido se ha comprobado que después del tratamiento a 134-138°C durante 18 minutos, la cantidad de infectividad *scrapie* o EEB que sobrevive, es relativamente constante, indistintamente respecto del título inicial como de si la infectividad procede de cerebro de ratón, *hamster* o bovinos (Taylor, 1996). Este tipo de curvas de inactivación pueden reflejar un efecto protector de agregación durante el proceso de inactivación que se produce en los macerados u homogeneizados de material cerebral y

no en el material sin diluir, es decir el material intacto, lo que podría explicar el resultado que se obtiene con materiales sólidos, no macerados.

Sobre la base de los datos anteriores, en el Reino Unido se ha aconsejado que los instrumentos utilizados en neurocirugía o cirugía oftalmológica con pacientes conocidos o sospechosos de padecer ECJ, deberían ser eliminados y no reciclados después del tratamiento en autoclave. Esta recomendación ha sido ampliada, incluso, a otros grupos de alto riesgo, como los parientes carnales de familias con una susceptibilidad conocida a ECJ e individuos que han sido receptores de tratamientos con hormonas derivadas de la pituitaria (somatotropina), de transplantes (parches) de duramadre o de injertos de córnea, procedentes de cadáveres humanos. También se ha advertido acerca de la posibilidad de contaminación cruzada y exposición laboral (Taylor y Bell, 1993). Por otra parte, considerando que el PrP^{Sc} de vECJ se detecta en los tejidos linforreticulares, se ha sugerido, también, que los instrumentos utilizados en cirugía general en casos sospechosos, también pueden necesitar el mismo tipo de tratamiento (es decir, no reciclar, sino eliminar del uso).

Se ha recomendado, igualmente, el uso de autoclaves de desplazamiento o de gravedad (*gravity-displacement autoclaving*), durante periodos de 1 hora a 132°C para la inactivación (Rosenberg *et al.*, 1986), aunque también se puede especular sobre su eficacia, pues datos preliminares (Prusiner *et al.*, 1984) del tratamiento (121°C 90 minutos) de material infectivo con la cepa 263K de *scrapie* pusieron de manifiesto una reducción del título inicial de infectividad de 6 unidades logarítmicas, pero sobrevivieron títulos de 3'4 logaritmos, en la misma línea que otros datos obtenidos diez años después por otros autores (Ernst y Race, 1993) (reducción de 5'7 unidades logarítmicas). Del mismo modo, incrementando la temperatura hasta 134°C y disminuyendo el tiempo hasta 30 minutos, el título logarítmico se redujo 5'3 unidades, pero la supervivencia prácticamente se mantuvo (Brown *et al.*, 1990).

Existen, también, otros datos más optimistas, como los obtenidos con la cepa *scrapie* 139 A, tratada a temperaturas de 126°C durante 2 horas, con inactivación total (Hunter y Millson, 1964) contrariamente a lo observado con la cepa 22 A, para la que fue necesario prolongar el tratamiento hasta 4 horas (Dickinson, 1976).

Con las cepas S.Co. y 263K, de ECJ se han descrito inactivaciones totales después de 1 hora a 132°C (Brown *et al.*, 1986), procedimiento que ha sido adoptado como método de

descontaminación estándar para la ECJ en USA y otros lugares (Rosenberg *et al.*, 1986), aunque estudios posteriores han puesto de manifiesto que este procedimiento no garantiza la inactivación completa (Ernst y Race, 1993; Pocciari, 1993; Taylor, 1996). Prusiner *et al.* (1984) han recomendado el uso del autoclave a 132°C durante 4'5 horas y Ernst y Race (1993) demostraron que la cepa 263K se inactivaba a 132°C durante 90 minutos. Con carácter oficial, la UE estableció la inactivación de los agentes de la EEB mediante un tratamiento de 133°C a 3 bares de presión y 20 minutos (Decisiones de la UE 96/449 y 99/534), aunque algunos expertos han demostrado que estas combinaciones solo deben ser consideradas aceptables si se consideran mínimas, pues si la carga infecciosa inicial es elevada no se consigue la inactivación total.

Tabla 2. Resumen de diversos estudios de inactivación de priones mediante el uso del autoclave de desplazamiento de gravedad

Agente y origen	Tª.	Tiempo	Resultado
263K (<i>scrapie</i> -hamster)	121°C	90 min	Disminución de 6 log (residual: 3'4 log)
263K (<i>scrapie</i> -hamster)	121°C	90 min	Disminución: 5'4 log
263K (<i>scrapie</i> -hamster)	134°C	30 min	Disminución 5'3 log. (residual: 3'3 log)
263K (<i>scrapie</i> -hamster)	132°C	60 h	Inactivación total ⁽¹⁾
263K (<i>scrapie</i> -hamster)	132°C	90 min	Inactivación total
263K (<i>scrapie</i> -hamster)	132°C	4'5 h	Inactivación total
139 A (<i>scrapie</i> -ratón)	126°C	2 h	Inactivación total
22 A (<i>scrapie</i> -ratón)	126°C	4 h	Inactivación total
S.Co. (ECJ-cobaya)	132°C	1 h	Inactivación total

(1): cuestionado por otros autores (57, 67, 68)

El calor seco posee menor poder de penetración que el húmedo y ello exige mayores temperaturas y tiempos de exposición, para conseguir los mismos resultados (Prescott, 1999; Rodríguez Ferri, 2001). En condiciones experimentales, muestras de cerebros de cricetos infectados con el agente del *scrapie* fueron expuestas a temperaturas de 150, 300, 600 ó 1.000°C, durante periodos de 5 ó 15 minutos. Los resultados pusieron de manifiesto que, solamente a 1.000°C se eliminaba por completo la actividad infectante, pues a 600°C, en los que ya se conseguía la incineración de las muestras, todavía el 14'3% de los animales inoculados resultaba infectado (Brown *et al.*, 2000).

Inactivación química.- La acción de los compuestos químicos también es diversa según el producto que se considere, aunque dos hechos destacan de forma general; por un lado, la mayoría de las sustancias utilizadas habitualmente en la desinfección de los agentes convencionales no se comportan de forma eficaz y los grupos más resolutivos suelen ser los alcalinos. Revisaremos cada uno de estos grupos, de forma independiente.

Álcalis: Las soluciones fuertemente alcalinas figuran entre los productos más eficaces frente a los priones. Brown *et al.*, (1986) señalaron que las cepas S.Co. y 263 de *scrapie* se inactivaban por completo después de la exposición a hidróxido sódico (NaOH) 1 M, durante 1 hora o más; ésta concentración eleva el pH del medio hasta valores próximos a 14. En la práctica, sin embargo, este tipo de ensayos no son fáciles de ejecutar, pues a las concentraciones utilizadas, los productos resultan demasiado tóxicos para ser inoculados en los animales de prueba, lo que obliga a diluir las muestras de forma importante o a neutralizarlas con ácidos.

No siempre la sosa se comporta de forma tan eficaz, pues parece que los tratamientos sobre la cepa 263K mantienen restos de infectividad (Diringer y Braig, 1989; Ernst y Race, 1993; Prusiner *et al.*, 1984), incluso después de 24 h. Estos resultados se han observado, también, con otras cepas como la kitasoto-1 y Fukuoka-1, en este último caso incluso con NaOH 2 M (Tamai *et al.*, 1988; Tateishii *et al.*, 1988). Cuando se inocula material infectivo (cepas ME7 y 263K de *scrapie* y el agente de la EEB), neutralizado después del tratamiento, puede mantenerse la infectividad después del tratamiento con NaOH 2M durante 2 horas (Taylor *et al.*, 1994) y, en el caso concreto de la cepa 263K, se recuperaron títulos de, al menos, 10^4 DL₅₀.

Ácidos: Desde hace tiempo se conoce que de los ácidos enérgicos, que reducen el pH de la muestra hasta valores de 2 e incluso menos, poseen una escasa actividad inactivadora de los priones (Mould *et al.*, 1965). Tratamientos con ácido clorhídrico (ClH), que consiguen valores de pH de 0'1, prolongados durante 1 hora, solo redujeron ligeramente los títulos de la cepa S.Co. de *scrapie* (Brown *et al.*, 1986).

Los ácidos orgánicos, sin embargo, parecen tener más actividad frente a estos agentes. El ácido fórmico (H-COOH), por ejemplo, solubiliza las proteínas y reduce 8 unidades logarítmicas la infectividad (Taylor, 1995).

Agentes alquilantes: El tratamiento con formaldehído no garantiza la inactivación total, ni siquiera a concentraciones altas (al 3'7% durante 4 horas solo consigue una inactivación del 90-95%). Este compuesto, que se utiliza habitualmente en los laboratorios de Anatomía Patológica con fines diagnósticos produce, además, una fijación proteica (también se produce por derivados como el paraformaldehíd o-lisina-peryodato, o mediante etanol) que exalta sustancialmente la resistencia al calor en el autoclave, lo que supone un inconveniente añadido importante a la hora de eliminar los restos de materiales utilizados y un motivo de preocupación desde el punto de vista laboral. Los niveles de infectividad del tejido fijado pueden reducirse (> de 5 unidades logarítmicas; experimentalmente, $\leq 10^{25}$ DI₅₀/g desde niveles iniciales de 10^8 DI₅₀/g) mediante el tratamiento con ácido fórmico a concentraciones del 96% o superiores, durante 1 hora (tanto en el caso de *scrapie* como del agente de la EEB), con la particularidad de que no altera la calidad de las preparaciones. De igual modo, se comportan otros agentes alquilantes, como el glutaraldehído, el óxido de etileno, el acetilileneimine o la β -propiolactona.

Fenoles: En general, se consideran mucho menos eficaces que los álcalis (Taylor, 1996). Experiencias llevadas a cabo a temperatura ambiente, con un preparado comercial a base de fenoles clorados al 0'6%, no proporcionaron resultados satisfactorios (Kimberlin *et al.*, 1983). En otros estudios, productos a base de fenol al 4% y derivados fenólicos, mostraron una escasa capacidad de inactivación frente a las cepas 22 A y 301 del agente del *scrapie* ovino (Brown *et al.*, 1983; Dickinson y Taylor, 1978; Gajdusek y Gibbs, 1968; Hunter y Millson, 1964; Kimberlin *et al.*, 1983).

Compuestos liberadores de halógenos En el caso de los compuestos, como el hipoclorito sódico, están situados los agentes más resolutivos frente a los priones, pues soluciones con hasta 25.000 ppm de cloro activo han inactivado por completo las cepas S.Co. y la 263K en diverso tipo de experimentos (Brown *et al.*, 1986); incluso se ha citado que las cepas 22 A y 139 A, expuestas a soluciones con 13 a 750 ppm de cloro disponible se inactivaron en tan solo media hora (Kimberlin *et al.*, 1983). Taylor *et al.* (1994) utilizando material infeccioso de EEB, no obtuvieron restos de infectividad después del tratamiento durante 30 a 120 minutos con una solución que proporcionaba entre 8.250 y 16.500 ppm de hipoclorito sódico y si se utilizaba dicloroisocianurato sódico se recuperaba algún grado de

infectividad debido a que este último producto liberaba 3'5 veces menos cloro que el hipoclorito. En la práctica, se recomiendan 20.000 ppm de hipoclorito sódico durante 1 hora, para la inactivación total.

En el caso del yodo se ha documentado que el tratamiento de material infectivo de *scrapie* con yoduro sódico al 2% durante 4 horas, sólo produce una reducción discreta de la infectividad (Brown *et al.*, 1982), comparable a los resultados obtenidos después del tratamiento de material de la ECJ con yodóforos que contenían un 0'8% de yodo (Asher *et al.*, 1981). Las sales están, por el momento, sometidas a controversia pues, por ejemplo, en el caso del metaperiodato sódico, mientras que para unos posee un efecto considerable sobre la infectividad del agente del *scrapie* (Hunter *et al.*, 1969), otros autores sostienen lo contrario (Adams *et al.*, 1972; Brown *et al.*, 1982; Dickinson, 1976).

Agentes oxidantes: En el caso del dióxido de cloro, solamente se ha obtenido una escasa reducción del título (Brown *et al.*, 1982), parecido a lo que se observa con peróxido de hidrógeno al 3% (Brown *et al.*, 1982). Sin embargo, resultan muy esperanzadores los resultados alcanzados con el ácido peracético actuando sobre homogeinizados de cerebro infectivo, en concentraciones bajas (2%), mientras que en concentraciones mayores (por encima del 7% y hasta el 18 ó 19%) se produce un fenómeno de agregación del material que le protege de la acción inactivante, probablemente relacionado con la mayor condición ácida del producto y la naturaleza hidrofóbica del prion (Taylor, 1991). El mismo fenómeno se observa cuando se compara el efecto del tratamiento sobre material intacto y material macerado, homogeinado y diluido, por ejemplo, al 10%. El ácido peracético es un desinfectante enérgico que podría plantearse como una alternativa adecuada para la inactivación de los priones en las prácticas médicas (Antloga, 2000). Finalmente, en el caso del permanganato potásico, tanto respecto de ECJ como del *scrapie*, se han aportado resultados contradictorios (Asher *et al.*, 1981; Brown *et al.*, 1982, 1986; Kimberlin, 1983).

Agentes caotrópicos: Para determinados investigadores, la urea resulta muy activa (Millson *et al.*, 1976) mientras que otros mantienen dudas sobre su eficacia (Brown *et al.*, 1986). El tiocianato de guanidina a concentraciones superiores a 4 M es relativamente eficaz con homogeinizados de cerebro, mientras que en concentraciones más bajas o derivados

menos caotrópicos, como el hidrocloreto de guanidina son menos eficaces. Se ha descrito que PrP^{Sc} se desnaturaliza en mayor o menor grado con hidrocloreto de guanidina 2-4 M, dependiendo del grado de purificación del material infeccioso y del pH.

Algunos autores han sugerido que el tiocianato de guanidina 0.4 M es un agente esterilizante efectivo para la descontaminación de instrumental contaminado por algunos tipos de ECJ (Manuelidis, 1998), aunque ni existen datos experimentales directos que apoyen esta afirmación, ni los experimentos (reducción de la infectividad en homogenizados de material infectado) pudieron llevarse a cabo directamente, a consecuencia del alto poder tóxico de esta sustancia, que tuvo que diluirse al menos 200 veces para los bioensayos (Manuelidis, 1997).

Detergentes: Los detergentes suaves, cualquiera que sea su carácter (aniónicos, catiónicos o no iónicos) carecen prácticamente de acción. Solamente, en el caso del dodecil sulfato sódico (SDS) se ha descrito algún efecto sobre el *scrapie* (Milsson *et al.*, 1976) y el prión del ECJ (Walker *et al.*, 1983). El sarcosil también reduce los títulos de infectividad aunque a concentraciones mucho más altas.

Disolventes orgánicos Resulta de interés su estudio, toda vez que en el origen de la infecciosidad de las harinas de carne y hueso, implicadas epidemiológicamente en la difusión de la EEB, se ha responsabilizado un cambio en la tecnología del procesado de su fabricación en el que, además de otras modificaciones tecnológicas de naturaleza física, se eliminó un tratamiento con hexano en caliente. En el caso de los ensayos llevados a cabo por Taylor *et al.* (1998), utilizaron petróleo o derivados como hexano, heptano o percloroetileno y apenas consiguieron una inactivación escasa de la cepa 22 A de *scrapie* y de la 301V de la EEB. Quedó así demostrado que el tratamiento independiente con solventes químicos, en la industria de fabricación de harinas en el RU poseía *per se* una escasa capacidad para inactivar tanto el agente del *scrapie* como el de la EEB.

Entre la extensa nómina de productos con esta naturaleza, se ha investigado la acción de varios de ellos sobre estos agentes, como la acetona o el cloroformo al 5%, (Brown *et al.*, 1983; Dickinson y Taylor, 1978; Gajdusek y Gibbs, 1968; Hunter y Millson, 1964; Kimberlin *et al.*, 1983), habiéndose documentado una escasa capacidad de inactivación de las cepas 22 A y 301V de *scrapie*.

Inactivación por tratamientos combinados físicoquímicos.- Aunque, por separado, tanto los tratamientos en autoclave, como con sosa no son completamente satisfactorios, la combinación consigue inactivar totalmente los priones. Diversos autores han descrito un proceso secuencial, capaz de inactivar totalmente al agente del *scrapie*, que incluye el tratamiento con NaOH 1 M, seguido del autoclave durante 30 ó 60 minutos a 121°C (Ernst y Race, 1993; Taguchi *et al.*, 1991). También se han comunicado resultados similares en la cepa 263K, con tratamientos de 90 minutos a 121°C en presencia de NaOH 1 M (Prusiner *et al.*, 1984). Más recientemente, trabajando con la cepa 22 A, tratada a 121°C durante 30 minutos en presencia de NaOH 2 M, también se obtuvo la inactivación total del agente. Incluso, tratamientos por hervido en NaOH 1M durante 1 minuto, han revelado los mismos resultados. Aunque no se conoce la razón de estos resultados, se sospecha que el principal responsable de la sensibilidad al calor tiene que ver con el elevado pH alcalino.

Los sistemas de trabajo que incorporan sosa poseen el inconveniente del riesgo laboral de trabajar con esta sustancia caústica, así como el deterioro del material, lo que obliga a desarrollar contenedores capaces de resistir el tratamiento (de acero inoxidable o de vidrio o de un tipo de plástico adecuado en los que se puedan depositar herméticamente los residuos y donde se pueda mantener la solución caústica).

Igualmente se ha descrito cierto tipo de efectividad combinando calor y algunos detergentes, como el SDS (hervido del material infectante durante 3 minutos en una solución de SDS al 3%) (Tateishi *et al.*, 1991) aunque no todos los datos coinciden, pues los macerados de muestras de 50 mg de cerebro a temperatura ambiente, hervidas (o tratadas en autoclave a 121°C) durante 15 minutos en SDS al 5% conservan infectividad residual, según algunos autores. En cualquier caso, el uso de SDS en caliente debería restringirse para procedimientos que impliquen líquidos contaminados.

Tratamientos biológicos.-La información existente sobre la resistencia de los priones a los agentes biológicos, del tipo de enzimas y similares, es mucho más escasa que la que se refiere a los agentes físicos y químicos. Aunque el modo de diferenciar la isoforma infecciosa de la celular reside en la resistencia de la primera al tratamiento con proteínasa K debido a la estructura de láminas β , algunos estudios señalan que esta proteasa es capaz de reducir de forma significativa el título de priones después de periodos de digestión prolongados (Prusiner *et al.*, 1981); a este respecto, en una investigación en la que se

emplearon diferentes mutantes de un miniprión, de 106 aminoácidos (denominado PrP106), infeccioso para ratones transgénicos, y que adopta de forma espontánea conformaciones que se asemejan parcialmente a la de PrP^{Sc}, se observó que la resistencia a la proteínasa K dependía del mutante seleccionado, de modo que algunos no soportaban una digestión durante 1 hora a 37°C en condiciones de astringencia, en una proporción proteína/enzima de 25:1, a diferencia de lo que sucedía con otros. En este último caso, los fragmentos resistentes a proteasas se correspondían con pesos moleculares de 19 y 23 kDa, dependiendo del mutante (Suppatapone *et al.*, 2000).

A partir de PrP^{Sc} extraídos de cerebros de ovejas que padecían *scrapie*, se ha comprobado que la resistencia del prión a la proteínasa K disminuye en gran medida a un pH alcalino (pH 10) y en presencia de concentraciones de urea superiores a 3 M o de tiocianato de guanidina superiores a 0,75 M (Madec *et al.*, 1997.). Otros estudios, llevados a cabo sobre proteínas priónicas de levaduras (Komar *et al.*, 1997), han revelado que el grado de resistencia a la proteínasa K está vinculado a diferentes factores, como el sistema de traslación empleado o la presencia de proteínas accesorias. La pronasa es una proteasa de amplio espectro, que también resulta eficaz frente a los priones (sobre el agente del *scrapie* obtenido a partir de cerebro de ratón es capaz de reducir su infectividad un 98%) y su actividad se ve potenciada si se combina con SDS (Milson *et al.*, 1976), aunque en otras investigaciones también desarrolladas sobre cerebro de ratón, se descarta la actividad proteolítica directa atribuyéndose la eficacia de los tratamientos anteriores a otro tipo de actividad no descrita. Finalmente, el QuiagenTM, también es activo, mientras que la eficacia de la tripsina en condiciones no desnaturizantes, resulta escasa (Taylor, 2000).

Respecto del tratamiento con nucleasas, ni PrP^C ni PrP^{Sc} son sensibles, lo cual correlaciona con su condición proteica. Recientemente se ha descrito la acción proteolítica de secreciones de bacterias de origen ambiental (Domínguez, 2001) capaces, después de una incubación de 72 horas o menos, con material infectivo, de eliminar la señal que reconocen diversos anticuerpos específicos en un inmunoblotting.

Péptidos sintéticos Estudios recientes han demostrado que el tratamiento de PrP^{Sc} con péptidos sintéticos que rompen la lámina β , provoca una reversión de la resistencia a las proteasas de esta forma isomérica, hasta hacerla similar a la de PrP^C. Este efecto se comprobó al incubar material infectado por *scrapie* con el citado péptido, durante 48 horas y

posteriormente probando este material en un modelo murino. Se observó que se producía una disminución de la infectividad entre el 90 y el 95%, en relación con los controles (Soto *et al.*, 2000). Queda aún por dilucidar si los péptidos que rompen la lámina β podrán utilizarse en un futuro próximo para el tratamiento de las enfermedades producidas por los priones.

Antibióticos y otros compuestos: Pocos son los antibióticos que han revelado una eficacia siquiera mínima en el control terapéutico de las enfermedades producidas por priones. Desde hace más de una década, se sabe ya que los compuestos poliénicos, como la anfotericina B y su derivado, el MS8209, presentan actividad frente a los priones. Así, por ejemplo, se ha observado que, en *hamsters* infectados por vía intracerebral con las cepas *scrapie* 263K y DY, el tratamiento con ambos productos alarga considerablemente el periodo de incubación de la enfermedad (Adjou *et al.*, 1995; Demaimay *et al.*, 1999) y, a nivel celular, el acúmulo de PrP^{Sc} en el cerebro (Xi *et al.*, 1992). Además, se sospecha que las neuronas son lugares fundamentales de la acción de estos antimicrobianos, del mismo modo que se ha descartado el bazo como órgano de acción del MS-8209. Más recientemente, se ha demostrado que la anfotericina B puede inhibir la formación de PrP^{Sc}, no sólo sobre modelos animales, sino también en cultivos celulares, como es el caso de las células GT1 -7 y N2a (Mangé *et al.*, 2000).

Efectos similares a los de los compuestos poliénicos han sido obtenidos con la antraciclina, también en *hamsters* inoculados por vía intracerebral (Tagliavini *et al.*, 1997). En experimentos llevados a cabo con ratones transgénicos, se ha comprobado que la doxiciclina es capaz de ejercer una cierta modulación de la isoforma patógena, sin apenas sintomatología (Tremblay *et al.*, 1988). Continuando con este mismo grupo de antibióticos, se ha demostrado que la tetraciclina revierte la resistencia a las proteasas de la PrP^{Sc} extraída del cerebro de los pacientes humanos de la ECJ, a la vez que previene la muerte neuronal y la proliferación astrocitaria inducida por los priones *in vitro*, lo que parece convertir a este antimicrobiano es un prototipo de sustancias capaces de inactivar las isoformas patógenas de los priones (Tagliavini *et al.*, 2000). El problema de estos compuestos, como el de otros como los polianiones sulfatados (Ladogana *et al.*, 1992) o el colorante rojo Congo, que también han sido objeto de estudios prospectivos en los que se señalaba la inhibición de la acumulación de priones y de la replicación de la infectividad en el interior de célula, radica en que su potencial de inhibición de la propagación de los priones

es muy discreto, además de que ninguno de ellos ha sido capaz de eliminar los priones existentes en las células infectadas (Suppatapone *et al.*, 1999).

Por otro lado, se ha comprobado que el empleo de poliaminas ramificadas (como la polipropileneimina, la polietileneimina y los dendímeros de la poliamidoamida) produce la eliminación de la isoforma patógena de cultivos de células de neuroblastoma (ScN2a), infectadas con *scrapie*. Este efecto es dependiente de la concentración y del tiempo de exposición de estos productos, de modo que la exposición durante una semana a concentraciones bajas, no tóxicas, es capaz de reducir los PrP^{Sc} hasta niveles inferiores al umbral de detección, condición que se mantiene durante, como mínimo, tres semanas tras la aplicación de las poliaminas ramificadas. Se ha observado igualmente que la exposición de extractos de cerebro infectados con *scrapie* a estas sustancias, a un pH ácido, provoca la susceptibilidad de las formas PrP^{Sc} a la acción de las proteasas (Suppatapone *et al.*, 1999).

GENÉTICA Y SUSCEPTIBILIDAD

PrP^C y PrP^{Sc} están codificadas por el mismo gen del hospedador (Oesch *et al.*, 1985), identificados en distintos mamíferos (hombre, mono, hamster, ratón, rata, visón y ganado bovino) (Goldman *et al.*, 1993; Oesch *et al.*, 1991; Schatzl *et al.*, 1995) y también en las aves domésticas (Gabriel *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1991). En el hombre, el gen *Prnp* se localiza en cromosoma 20, mientras que en el ratón lo hace en el 2, siendo el ARNm el que traduce la proteína PrP^C de 33-35 kDa. El marco de lectura abierto, completo, de todos los genes PrP conocidos está codificado por un exón simple y comprende entre 253 y 257 codones, respectivamente en el caso del hombre y del visón (Gabriel *et al.*, 1992).

La relación entre el gen *PrP* y las encefalopatías espongiformes se ha establecido en estudios desarrollados en ratón y en ovejas, especialmente en lo que se refiere a la susceptibilidad y periodo de incubación, aunque ambas características están relacionadas. En el ratón, el gen que codifica para la susceptibilidad al *scrapie* experimental, *Prnp*, está situado en el cromosoma 2 y de él, se han descrito dos alelos (*Prnp^a* y *Prnp^b*), cada uno de los cuales codifica una PrP distinta, que difiere en los codones 108 y 189. En el *Prnp^a*, en la primera posición hay leucina y en la posición 189 hay treonina, mientras que en el otro alelo, en la posición 108 hay fenilalanina y en la 189 hay valina. Mediante el uso de ratones transgénicos se ha podido establecer la relación entre *Prnp* y susceptibilidad. Ratones

transgénicos en los que se ha expresado un gen PrP del hamster sirio (Sha) convierte a los animales en altamente susceptibles a los priones Sha, lo que demuestra que la expresión de un gen *Prnp* extraño puede salvar la barrera de especie sin dificultad (Scott *et al.*, 1989). Por otra parte, ratones a los que se ha bloqueado el gen *PrP* (ratones nulos, *Prnp*^{0/0}) son resistentes a la infección por priones (Prusiner *et al.*, 1993; Raeber *et al.*, 1998).

El periodo de incubación es un aspecto muy importante de las encefalopatías espongiformes, hasta el punto de que es considerada una de las características comunes más llamativas. Como el gen *PrP* está ligado a un locus que controla el periodo de incubación (Carlson *et al.*, 1986) no sorprende la relación entre susceptibilidad y periodo de incubación.

Trabajando con distintas cepas de priones (cepas RML -Rocky Mountain Laboratory, 22A y 87V), con el fin de determinar la influencia del periodo de incubación, pudo comprobarse que en la primera (RML), su alelo **a**, codificaba para periodo de incubación corto, mientras que el alelo **b** lo hacía para periodo de incubación largo, y que el alelo **a** era dominante y el **b** es codominante para el carácter 'periodo largo'. Todo ello supone que los homocigotos **b/b** manifiestan periodos de incubación tan largos que normalmente no desarrollan la enfermedad, por lo que son resistentes. En la cepa 22A, **a** es el alelo dominante y codifica para el periodo de incubación largo, mientras que **b**, que es recesivo, codifica para periodo de incubación corto. Los heterocigotos **a/b** poseen periodos de incubación tan largos como los homocigotos **a/a**, mientras que los homocigotos **b/b** poseen los periodos de incubación más cortos. Algo parecido ocurre con la cepa 87V. Los periodos de incubación en el ratón han sido utilizados para distinguir las cepas príon.

Los primeros estudios, en ovejas, para definir los genes que afectan al periodo de incubación en las ovejas se llevaron a cabo con animales de la raza Cheviot. En las ovejas se ha descrito un gen del periodo de incubación (*Sip*), con dos alelos codominantes (**a** y **b**). De esta manera, el gen que codifica para PrP, es el responsable de diferencias en la susceptibilidad al *scrapie*; **a** codifica para periodo de incubación corto y **b** lo hace para periodo de incubación largo; **aa** determina periodo de incubación corto; **bb** lo hace para largo y **ab** para periodo de incubación intermedio (Hunter, 1997). Utilizando ratones transgénicos, a los que se bloqueó su propio gen, introduciéndoles el gen específico del ovino, pudo determinarse que el genotipo homocigoto para el alelo **a**, que codifica para

periodo de incubación corto, resulta determinante, mientras que el homocigoto para el alelo b, codifica para el periodo de incubación largo, aunque este gen resulta, como en el ratón, codominante, lo que hace que los heterocigotos incluyan situaciones intermedias.

Dentro del gen *PrP* ovino, se han descrito polimorfismos en al menos tres posiciones: 136, 154 y 171, resultando particularmente importantes los codones 136 y 171, como se puede observar en el cuadro siguiente.

Tabla 3. Polimorfismos de genes que codifican para PrP, que modulan el *scrapie* experimental en ovejas Cheviot

Codón 136	Codón 171	Periodo de incubación (días). Media	Periodo de incubación (días). Rango	n
V/V	Q/Q	170±16	70-230	9
V/A	Q/Q	270±15	160-340	10
V/A	Q/R	364±17	280-540	15
A/A	Q/Q	≥998	NA	4
A/A	Q/R	≥828	NA	4
A/A	R/R	≥1149	NA	2

V=valina; A=alanina; Q=glutamina;R= arginina; NA= No aplicable. Inoculación sc del príon SSBP/1 (Westaway *et al.*, 1995)

La heterocigosis u homocigosis para valina (VV/AV) en el codón 136, también parece modular el *scrapie* natural en la raza Romanov, Île de France y otras (Swaledale y Shetland, por ejemplo). Por su parte, la homocigosis a glutamina (QQ) en el codón 171 convierte a las ovejas Suffolk, Romanov y Laucane, en susceptibles a las enfermedades por priones (Hunter, 1997). Considerando en conjunto los tres codones (136, 154 y 171), el genotipo que produce el periodo de incubación más largo y, por tanto, la menor susceptibilidad, coincide con la homocigosis a alanina, arginina y arginina, respectivamente, lo que se confirma por la infección experimental tanto con *scrapie* como con EEB. En la raza Suffolk, la homocigosis a alanina (136), arginina (154) y glutamina (171) produce los animales más susceptibles al *scrapie*, pero también es común entre los animales sanos

Tabla 4. Control de la susceptibilidad al *scrapie* natural del ganado ovino en el genotipo del codón 171

Raza de ovejas	Codón 136	Codón 171	Prevalencia de <i>scrapie</i>
suffolk	A/A	Q/Q	Afectados y sanos
	A/A	Q/R	Sanos
	ND	R/R	Sanos
Laucane	A/A	Q/Q	Afectados y sanos
Romanov	A/V	Q/Q	Afectados y sanos
	A/A	Q/H	Afectados y sanos
	A/A	Q/R	Sanos
	A/A	R/R	Sanos
	A/A	Q/H	sanos

(Westaway *et al.*, 1995)

Si en lugar de utilizar el aislado SSBP/1 se utiliza otro diferente (por ejemplo el CH1641 o, simplemente, el agente de la EEB), las consecuencias sobre la susceptibilidad o el periodo de incubación, varían sustancialmente. Por un lado, en el codón 136 el aminoácido determinante es ahora la alanina, aunque el verdadero determinante del periodo de incubación es ahora el codón 171. En definitiva, el periodo de incubación y la susceptibilidad al *scrapie*, es el resultado del genotipo y de la interacción entre al menos, los polimorfismos 136 y 171.

En el ganado bovino se han llevado a cabo muchos estudios pero no se han encontrado las mismas relaciones. Inicialmente se describieron dos polimorfismos en el gen *PrP*; el primero de ellos era un sitio de restricción silente HindIII y el segundo tiene que ver con el número de octapéptidos repetidos en la secuencia de la proteína (6 ó 5 copias, lo que da lugar a tres genotipos diferentes: 5/5 -el más raro, menos del 1% de los animales -, 6/5 – aproximadamente el 10% de los animales- ó 6/6 –el más común, por encima del 90% de los animales-) pero no se han apreciado diferencias que relacionen estos genotipos con animales sanos o con EEB (Hunter *et al.*, 1994; Neiberger *et al.*, 1994). Mas recientemente se ha vuelto a intentar mejorar el procedimiento de estudio trabajando con cinco estirpes genéticas de Holstein Frisian concluyéndose que, por el momento, no existen evidencias ni moleculares ni estadísticas que relacionen la variación genética con la susceptibilidad (Hau y Curnow, 1996).

En el hombre también se han descrito polimorfismos y su relación con la susceptibilidad, siendo los más comunes los que se presentan en los codones 117 (alanina → alanina) y 129 (metionina → valina). La homocigosis para metionina (*MM*) o valina (*VV*) en el codón 129, parece incrementar la susceptibilidad a la enfermedad de CJ y la gran mayoría de los casos de la variante de la ECJ descritos en UK (el 96'85%) se corresponden con homocigotos a metionina (*MM*).

BARRERA DE ESPECIE

El pase de los priones entre especies, se considera un proceso estocástico, caracterizado por periodos de incubación prolongados durante el primer pase en el nuevo hospedador. Esta prolongación del periodo de incubación se refiere como '*barrera de especie*' y tiene el mismo sentido que el fracaso de la transmisión, interpretándose como un tipo de defensa natural, que se opone a la transmisión interespecífica. En los pases sucesivos por hospedadores homólogos, los tiempos de incubación se van acortando progresivamente, como consecuencia de la adaptación, hasta alcanzar valores semejantes a los del donador (especie animal de procedencia del prión). Desde los años 70 se sabe, por ejemplo, de la dificultad para transmitir a los visones o a los roedores (ratones y hamsters) el prurito lumbar ovino, o de la dificultad para transmitir al ratón, el agente de la EEB. En este último caso, por ejemplo, son necesarias dosis 10.000 veces superiores a las que se necesitan de PrP^{Sc} para producir la enfermedad en el ganado bovino.

La síntesis de priones '*de novo*' (esto es PrP^{Sc}) siempre refleja la secuencia del gen *PrP* del hospedador. A partir de estudios con ratones transgénicos se han identificado varios factores que contribuyen a la barrera de especie.

1) Por un lado, se considera la cepa del prion infeccioso, que a su vez debe entenderse tanto por las diferencias en las secuencias de la PrP entre el prión donante y el prión del individuo receptor, como en lo que se refiere a la propia estabilidad biológica de la cepa prión. En relación con lo primero, cuanto mayor sea el grado de homología entre las secuencias del prión propio y del prión infeccioso, tanto mayores posibilidades existirán para atravesar la barrera de especie y que el hospedador (receptor) adquiera la enfermedad priónica; respecto de lo segundo se refiere a la mayor o menor facilidad con que un prión

cambie sus caracteres biológicos al pasar por animales. Si el prión es inestable, tendrá mayor capacidad para atravesar esa barrera protectora.

2) Se considera también la especificidad de especie de la proteína X, a la que ya nos hemos referido, que a través de su capacidad de actuación como un chaperón, se une a la PrP^c y facilita, o no, la formación de PrP^{Sc}.

3) La vía de infección utilizada, aspecto éste muy importante en la transmisión de una especie animal a otra, como ha podido comprobarse en estudios llevados a cabo con ratones. En el caso del *scrapie*, por ejemplo, la inoculación intracerebral resulta particularmente eficaz, mientras que la vía digestiva se considera mala, siendo la relación de eficacia entre ambas de 1:125.000 (se necesita una dosis 125.000 veces más alta para producir la enfermedad por vía digestiva, comparada con la vía intracerebral). La vía subcutánea, se considera intermedia.

4) La dosis infecciosa, pues aunque algunas vías son escasamente eficaces, a igualdad de dosis, cuando ésta aumenta y se mantienen la exposición durante mucho tiempo, la eficacia puede compensarse.

Como se ha señalado antes, los pases sucesivos por el hospedador homólogo, acortan el periodo de incubación e influyen positivamente en la capacidad de infección interespecífica.

Desde un punto de vista práctico, el salto de la barrera de especie supone, para estos agentes, la modificación o adquisición de propiedades nuevas, que tienen que ver con la susceptibilidad o resistencia a la infección y también con la propia especificidad. En los primeros tiempos de estos estudios, por ejemplo, se observó que las cabras eran muy resistentes a la infección por el agente de la EEB y los gatos muy sensibles. Utilizando cepas de EEB pasadas por gato, se conseguía sin dificultad la infección de las cabras. De hecho, este es el problema acaecido respecto del *scrapie* y el hombre, pues el último es resistente al prión del *scrapie*, pero resultó susceptible cuando el prión se adaptó al bovino para dar origen a la EEB.

CEPAS DE PRIONES

En varias enfermedades por priones se ha descrito una amplia (más o menos) diversidad priónica. En términos generales se ha considerado la existencia de dos tipos de PrP^{Sc} definidos por su tamaño y diferencias en el modelo de glucosilación (Parchi *et al.*,

1996). Dentro de los tipos, las cepas se han definido, biológicamente en relación con los periodos de incubación de los tres genotipos *Sinc (Prn-i)* y el perfil y distribución de la vacuolización neuronal. Una cepa, en particular, es determinada por una evaluación semicuantitativa del daño patológico que se valora en nueve regiones del cerebro. Estos patrones, que se expresan gráficamente, se denominan 'perfiles anatomopatológicos o firmas' (Bruce *et al.*, 1994). Desde el punto de vista molecular se consideran, con el mismo propósito: 1) el patrón de glucosilación y 2) el perfil de proteólisis endógena o exógena (Collinge *et al.*, 1997; Houston *et al.*, 2000, Somerville *et al.*, 1997; Somerville y Ritchie, 1990).

El tipado de cepas de priones en distintas razas de ratones (C57BL, VM) y (C57BL x VM) F1 se inicia después del aislamiento. En la actualidad se han descrito más de 20 cepas de *scrapie*, 1 en la EEB y 4 en la ECJ (el cuarto tipo se corresponde con la cepa de la EEB).

Algunas de las cepas de *scrapie* más conocidas y que han sido objeto de múltiples estudios, incluyen las Chandler; 139 A ; 22L , 87V; 22 A; RML ; ME7; 263 K; S.Co. ; DY; 87V; Kitasoto-1 y Fukuoka-1. Las cepas prototípicas ME7 y 22A dan periodos de incubación de aproximadamente 150 y 400 días, respectivamente, en ratones C57BL.

En estudios llevados a cabo, inicialmente, a partir de cepas humanas se ha podido establecer que la variación de cepa está sujeta a una combinación de conformación PrP y glucosilación, pudiendo influir también los polimorfismos de la secuencia de PrP en la generación de conformaciones particulares de PrP^{Sc} (Collinge *et al.*, 1996). Como la glucosilación se produce antes de la conversión de PrP^c en PrP^{Sc}, las diferentes proporciones de las glicofomas podría representar, en realidad, una selección de una glicofoma en particular por PrP^{Sc} de diferentes conformaciones. Así pues, de acuerdo con esta hipótesis, la conformación de PrP sería el determinante primario del tipo de cepa, implicándose la glucosilación como un proceso secundario (Collinge, 2001). Recientemente se ha demostrado, también, que la conformación específica de cepa puede estar influenciada por la unión de metales (en particular, cobre y zinc) a PrP^{Sc} (Wadsworth *et al.*, 1999), lo cual representaría un mecanismo nuevo para la modificación post-traduccional de PrP y para la generación de múltiples cepas de priones.

INFECTIVIDAD

El grado en que un tejido puede transmitir una enfermedad, se expresa como Unidades Infecciosas (UI); de este modo, una UI es la mínima cantidad de un tejido que se requiere para infectar otro animal de la misma especie por inoculación intracerebral.

Como se ha señalado en otro lugar, en las EET, la infectividad se mide por bioensayos en ratón o en *hamster* y se calcula en log de unidades infecciosas por gramo (Dealer, 1993). Utilizando la oveja como ejemplo, la infectividad de distintos tejidos irían desde el caso de los músculos o de los riñones en un extremo (aproximadamente 2^5) < adrenales < pituitaria < nervios, tejido linfoide < médula espinal, intestino < cerebro (aproximadamente 7).

Aunque es fácil transmitir la EEB al ratón, es mucho más fácil transmitirla a las terneras a consecuencia de la ausencia de la barrera de especie. Wilesmith (1996) señaló que la inoculación intracerebral experimental de cerebro de vacas infectadas de EEB en terneras era 1.000 veces más sensible que los bioensayos en ratones y de hecho, tejidos que no manifiestan infectividad en el ratón, pueden probarla cuando se inoculan por vía intracerebral en las terneras. A este respecto, ni los ganglios linfáticos ni el bazo (que son negativos en los bioensayos en ratón) han demostrado infectividad en los bioensayos con terneras.

Wuthrich (1996) señaló que la mayoría de la EETs poseen aproximadamente 10^7 a 10^8 UI/mg de tejido, lo que supondría 1 UI por cada 10^5 moléculas de PrP^{Sc}. No obstante hay que señalar que algunos tejidos son mucho más infecciosos que otros y que por ello pueden transmitir la enfermedad a dosis bajas (de tejido). Ello supone que para inactivar o reducir la infectividad, en estos casos se necesitarían tratamientos más fuertes, como los que han sido mencionados en el apartado correspondiente.

La dosis infecciosa (que como se ha indicado en otro lugar, coincide aquí con la dosis letal), se expresa en términos de DL₅₀ (la mínima cantidad que origina la muerte del 50% de los animales inoculados). La infectividad del *scrapie* (que se considera similar a la de la EEB) es de aproximadamente 10^7 DL₅₀/g de tejido por vía intracerebral (Collinge *et al.*, 1995) siendo éste extremo (la dosis) una cuestión muy importante pues siempre está relacionada con la vía de exposición, hasta el punto de que, por ejemplo, la dosis oral es 10^5 veces menos efectiva que la intracerebral (Kimberlin y Walker, 1978). En el caso de la EEB, un

gramo de tejido cerebral administrado por vía intracerebral en el ratón, parece que contiene entre 10^7 y 10^{10} DL₅₀.

PATOGENESIS

La mayor parte de la información (escasa) disponible en la actualidad, procede directa o indirectamente del prurito lumbar ovino, bien a partir de estudios realizados en el hospedador natural o en hospedadores de laboratorio, convencionales o transgénicos.

Se sabe que la vía ordinaria de contagio e infección es la oral. Desde el intestino delgado (ileon), a nivel de las placas de peyer, los priones infecciosos comienzan a replicarse sobre los priones celulares y se dirigen al órgano principal del sistema linforreticular (el bazo), donde continúan replicándose sobre las células dendríticas, igual que en los ganglios. A través de los nervios que componen la red del sistema autónomo del intestino, los priones acceden a la médula espinal y por ella al encéfalo. Alternativamente pueden llegar al sistema nervioso a través de la corriente sanguínea, y en este caso parece que son los linfocitos B los encargados de transportar el agente.

En conjunto, el proceso es de larga duración pero además, la aparición de síntomas exige la acumulación de gran cantidad de priones infecciosos a nivel del SNC, especialmente a nivel del encéfalo, lo que alarga aún más el periodo de tiempo que va desde que se produce la infección con una dosis suficiente, hasta que las manifestaciones clínicas son visibles.

El modelo ovino parece que no es extrapolable en su totalidad a otras especies. Al menos, en el caso de la EEB en el ganado bovino, el bazo no presenta infectividad detectable, lo que le diferencia de lo que ocurre en las ovejas; de hecho, en esa especie parece que el tejido linfoide no es rico en priones infecciosos. Además, parece que la infecciosidad del ileon es aún más precoz en las ovejas que en las vacas, según se desprende de algunos estudios realizados.

Como se ha señalado en otro lugar, la naturaleza molecular precisa de la causa de muerte neuronal no está clara. Se han proporcionado, hasta la fecha, varias hipótesis para explicar el mecanismo esponjiforme y la pérdida de neuronas, incluyendo el efecto neurotóxico debido a una región de la proteína prion que comprende los residuos 106 a 126

(Brown *et al.*, 1997) que tendría la capacidad de incrementar el estrés oxidativo de la neurona, como resultado de una deplección de PrP^c, en función de su capacidad de molécula antioxidante; se trataría por ello de un desequilibrio originado por la pérdida de PrP^c, aunque datos recientes plantean cierta controversia respecto de esa neurotoxicidad (Kunz *et al.*, 1999). También se ha sugerido que PrP^c desempeñaría alguna función importante en el control de la apoptosis, con lo que cuando los niveles normales de esta proteína se alteran como consecuencia de la infección, se produciría la muerte celular (Kurschner & Morgan, 1996). En cualquier caso, la causa de la neurodegeneración en las encefalopatías espongiformes, no está aclarada y, al menos en parte, debe estar relacionada con la pérdida de función de la PrP^c.

INMUNIDAD

Una de las condiciones comunes a todas las encefalopatías espongiformes y que las definen es, sin duda, la prácticamente ausencia de respuesta inflamatoria e inmune (Kasczak *et al.*, 1997). En relación con ello, PrP^{Sc} se considera un antígeno muy débil, aunque su inmunogenicidad puede exaltarse mediante desnaturalización. Katz *et al.*, (1995) expresaron en baculovirus una subunidad del gen PrP procedente de células de ovejas, obteniendo una proteína recombinante inmunoreactiva que manifestó buenos resultados para su aplicación diagnóstica. En los últimos años, preparaciones parcialmente purificadas de material infectivo de distinto origen han sido capaces de permitir la inducción de distinto tipo de anticuerpos, policlonales (en conejo) y monoclonales (en ratón), lo que ha facilitado su uso en métodos inmunológicos de diagnóstico. A este respecto, las zonas hidrofóbicas conservadas de la molécula de PrP^c y algunas regiones discontinuas (epítomos discontinuos) han proporcionado buenos rendimientos de inmunogenicidad.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D.H., Field, E.J. & G. Joyce. 1972. Periodate –an inhibitor of the scrapie agents?. *Res. Vet. Sci.*, 13: 195-198.

Adjou, K.t., Demaimay, R., Lasmezas, C., Deslys, J.P., Seman, M. & D. Dormont. 1995. MS-8209, a new amphotericin B derivative, provides enhanced efficacy in delaying hamster scrapie. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 39:12, 2810-2812.

Adjou, K.T., Demaimay, R., Lasmezas, C.I., Seman, M., Deslys, J.P. & D.Dormont. 1996. Differential effects of a new amphotericin B derivative MS8209, on mouse BSE and

scrapie: implications for the mechanism of action of polyene antibiotics. *Res. Virol.*, 147:4, 213-218

Aguzzi, A. & Ch. Weissmann. 1996. Spongiform encephalopathies. A suspicious signature. *Nature*. 383:666-667

Anderson, R.G.W. 1993. Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 5:647-652

Antloga, K., Meszaros, J., Malcheski, P.S. & G.E. McDonnell. 2000. Prion disease and medical devices. *ASAIO J.* 46:6, S69-S72

Asher, D.M. Gibbs, C.J., Diwan, A.R., Kingsbury, D.T., Sulima, M.P. & D.C. Gajdusek. 1981. Effects of several disinfectants and gas sterilisation on the infectivity of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. Abstracts of the 12th World Congress of Neurology, Kyoto

Bellinger-Kawahara, C., Cleaver, J.E., Diener, T.O. & S.B. Prusiner. 1987. Purified scrapie prions resist inactivation by UV irradiation. *J. Virol.*, 1987. 61:1, 159-166.

Borchelt, D.R., Scott, Taraboulos, A., Stahl, N., Telling, G. & S.B. Prusiner. 1990. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell. Biol.*, 110:743-752

Borchelt, D.R., Taraboulos, A. & S.B. Prusiner. 1992. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267:16188-16199

Bosque, P.J. & S.B. Prusiner. 2000. Cultured cell sublines highly susceptible to prion infection. *J. Virol.*, 74:9, 4377-4386

Bradley, R. 1999. BSE transmission studies with particular reference to blood. *Dev. Biol. Stand.*, 99:35-40

Brewer, M.S. 2001. Bovine spongiform encephalopathy-Food safety implications. *Adv. Food Nutr. Res.*, 43:265-317

Brockes, J.P., 1999. Topics in prion cell biology. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9:5, 571-577

Brown, P., Gibbs, C.J., Amyx, H.L., Kingsbury, D.T., Rohwer, R.G., Sulima, M.P. & D.C. Gajdusek. 1982. Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob disease virus. *New Engl. J. Med.*, 306:1279-1282.

Brown, P., Rohwer, R.G., Green, E.M. & D.C. Gajdusek. 1982. Effects of chemicals, heat and histopathological processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus. *J. Infect. Dis.* 145: 683-687

Brown, P., Rohwer, R.G., Green, E.M. & D.C. Gajdusek. 1983. The effect of chemicals, heat and histopathologic processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus. In

'*Virus non Conventionnels et Affections du Systeme Nerveux Central*' Eds L.A. Court & F. Cathala. Paris. Masson.

Brown, P., Rohwer, R.G. & D.C. Gajdusek. 1986. Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeldt-Jakob disease virus in brain tissue. *Journal of Infectious Diseases*. 153:1145-1148.

Brown, P., Liberski, P.P., Wolff, A. & D.C. Gajdusek. 1990. Resistance of scrapie agent to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360°C: practical and theoretical implications. *Journal of Infectious Diseases*, 161:467-472.

Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W.J., Schmidt, B., & H.A. Kretzschmar. 1997. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD1 activity. *Exp. Neurol.*, 146:104-112

Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G. & H. Fraser. 1994. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos. Trans.R.Soc.Lond. (B.Biol.Sci.)*, 343:405-411

Brown, D.R., Schmidt, B. & H.A. Kretzschmar. 1996. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*. 380. 345-347

Brown, P., Rau, E.H., Johnson, B.K., Bacote, A.E., Gibbs, C.J. & D.C. Gajdusek. 2000. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: threshold survival after ashing at 600 degrees C suggest an inorganic templated of the replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:7, 3418-3421

Carlson, G.A., Kingsbury, D.T., Goodman, P.A., Coleman, S., Marshall, S.T., DeArmond, S., Westaway, D. & S.B. Prusiner. 1986. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*. 46:4, 503-511

Caughey, R., Race, R.E., Ernst, D., Buchmeier, M.J. & B. Chesebro. 1989. Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol*. 63:175-181

Caughey, R. & G.J.Raymond. 1991. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem*. 266:18217-18223

Chiesa, R., Drisaldi, B., Quaglio, E., Migheli, A., Piccardo, P., Ghetti, B. & D.A.Harris. 2000. Accumulation of protease-resistant prion protein (PrP) and apoptosis of cerebellar granule cells in transgenic mice expressing a PrP insertional mutation. *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.*, 97:10, 5574-5579

- Cohen, F.E. & S.B. Prusiner. 1998. Pathologic conformations of prion proteins. *Annu. Biochem.* 67:793-819
- Collinge, J., 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu. Rev. Neurosci.*, 24:519-550
- Collinge, J., Hill, A.F., Sidle, K.C.L., & J.Ironside. 1997. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, 386, 564
- Collinge, J., Palmer, M.S. & K.C.L. Sidle. 1995. Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature*, 378:779-783.
- Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F. 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383:685-690
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S. & J. Begueret. 1997. The protein product of the Hets heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc.Natl.Acad.Sci. US* 94, 9773-9778.
- Dealer, S. 1993. Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the potential effect of the epidemic on the human population. *Br. Food J.*, 95:22-34
- Demaimay, R., Race, R. & B. Chesebro. 1999. Effectiveness of polyene antibiotics in treatment of transmissible spongiform encephalopathy in transgenic mice expressing Syrian hamster PrP only in neurons. *J. Virol.*, 73:3511-3513.
- Dickinson, A.G. 1976. Scrapie in sheep and goats. In 'Slow virus Diseases of animals and man'. Ed. R.H.Kimberlin, pp. 209 -241. Amsterdam: North -Holland .
- Dickinson, A.G. & D.M.Taylor, 1978. Resistance of scrapie agent to decontamination. *New England Journal of Medicine.* 229:1413-1414.
- Dickinson, A.A. & G.W. Outram. 1988. Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found. Symp.* 135
- Diringer, H. & H.R. Braig. 1989. Infectivity of unconventional viruses in dura mater. *Lancet* i, 439-440
- DHSS. Management of patients with spongiform encephalopathy (Creutzfeldt -Jakob disease (CJD)).DHSS Circular DS (1984) 84, 16
- Domínguez, L. 2001. Otras alternativas a la incineración de las harinas de carne. IV Reun. Monográfica 'Harinas de Carne en la Alimentación Porcina'. Anaporc. Madrid.
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorns, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E. & H.J. Dyson. 1997. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP (29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc.Natl. Acad. Sci., USA.* 94, 13452-13457

- Edenhofer, F., Rieger, R., Famulok, M., Wendler, W., Weiss, S. & E.L.Winnacker. 1996. Prion proteins PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J. Virol.*, 70:7, 4724-4728
- Ernst, D.R. & R.E.Race, 1993. Comparative analysis of scrapie agent inactivation. *Journal of Virological Methods*. 41: 193-202.
- Fisher, M.B., *et al.*, 2000. Binding of disease associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 408, 479-483
- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M.N., Racanajello, V.R., Skalka, A.M., Principles of Virology. Molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press. Washington, 2000
- Gabriel, J.M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. & S.B. Prusiner. 1992. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA.*, 89(19):9097-9101
- Gajdusek, D.C. & C.J.Gibbs. 1968. Solow, latent and temperate virus infections of the central nervous system. In '*Infections of the Nervous System*' Ed. H.M. Zimmerman., Baltimore; Williams & Wilkins.
- Gard, S. & O. Maaloe, 1959. Inactivation of viruses. In *The Viruses*. Vol. 1. Eds. F.M. Burnet & W.M.Stanley, pp 359-427. New York Academic Press.
- Gardner, J.F. & M.M. Peel. Introduction to sterilization, disinfection and infection control. Churchill Livingstone. 1991. Edinburg
- Gasset, M. & D. Westaway. 2000. Prions and their biology.*Rev. Neurol*, 31(2):129-132
- Gibbs, C.J., Gajdusek, D.C. & R. Latarjet. 1978. Unusual resistance to ionizing radiation of the viruses of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 75:12, 6268-6270
- Goldman, S., Laird, A., Flament -Durand, J., Luxen, A., Bidaut, L.M., Stanus, e., Hildebrand, J. & S. Przedborski. 1993. Positron emission tomography and histopathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 43:9, 1828-1830
- Gorodinsky, A. & D.A. Harris. 1995. Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *J. Cell. Biol.*, 129:619-627
- Griffith, J. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature*. 215:1043-1044
- Harris, D.A., Falls, D.L., Johnson, F.A. & G.D. Fischbach. 1991. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 88:17, 7664-7668
- Harris, D.A. 1999. Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microb. Rev.*, 12:3, 429-444.
- Harris, D.A., Lele, P., Snider, W.D. 1993. Localization of the RNAm for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc.Natl. Acad. Sci., USA*, 90:4309-4313

- Houston, F., Foster, J.D., Chong, A., Hunter, N. & Bostock, C.J. 2000. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*, 356: 9234, 999-1000
- Hunter, N. 1997. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. *Trends in Microbiol.*, 5:8, 331-334
- Hunter, N. 1999. Prion diseases and the central dogma of molecular biology. *Trends Microbiol.*, 7:7, 265-266
- Hunter, G.D., Gibbons, R.A., Kimberlin, R.H. & G.C. Millson. 1969. Further studies of infectivity and stability of stracts and homogenates derived from scrapie affected mouse brains. *J. Comp. Pathol.*, 79:101-108.
- Hunter, N., Goldmann, W., Smith, G. & J. Hope. 1994. Frequencies of PrP gene variants in healthy cattle and cattle with BSE in Scotland. *Vet. Rec.*, 135:17, 400-403
- Hunter, G.D. & G.C. Millson. 1964. Further experiments on the comparative potency of tissue extracts from mice infected with scrapie. *Res. Vet. Sci.*, 5:149-153
- Kascsak, R.J., Fersko, R., Pulgiano, D., Rubenstein, R. & R.I. Carp. 1997. Immunodiagnosis of prion disease. *Immunol. Invest.*, 26:1-2, 259-268
- Katz, J.B., Shafer, A. & J.M. Miller. 1995. Production of antiserum for the diagnosis of scrapie and bovine spongiform encephalopathy using a baculovirus-expressed prion protein antigen. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7:245-247.
- Kimberlin, R.H. & C.A. Walker. 1978. Pathogenesis of mouse scrapie: effect of route of inoculation in infectivity titres and dose-response curves. *J. Comp. Pathol.* 88:39-47
- Kimberlin, R.H., Wilker, C.A., Millson, G.C., Taylor, D.M., Robertson, P.A., Tomlinson, A.H. & A.G. Dickinson. 1983. Disinfection studies with two strains of mouse passaged scrapie agent. *Journal of the Neurological Sciences.* 59:355-369.
- Komar, A.A., Lesnik, T., Cullin, C., Guillemet, E., Ehrlich, R. & C. Reiss. 1997. Differential resistance to proteinase K digestion of the yeast prion-like (Ure2p) protein synthesized in vitro in wheat germ extract and rabbit reticulocyte lysate cell-free translation systems. *FEBS Lett* 415:1, 6-10.
- Krakauer, D.C., Pagel, M. & T.R.E. Southwood. 1996. Phylogenesis of prion protein. *Nature.* 380. 675
- Krasemann, S., Groschup, M.H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. & Bodemer, W. 1996. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice. *Mol. Med.*, 2:6, 725-734
- Kunz, B., Sandmeier, E., Christen, P. 1999. Neurotoxicity of prion peptide 106-126 not confirmed. *FEBS Lett.*, 458:65-68

Kurschner, C., Morgan, J.I., 1996. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes Bc1-2 family members and the cellular prion protein. *Brain Res. Mol., Brain Res.*, 37:249-258

Ladogana, A., Casaccia, P., Ingrosso, L., Cibati, M., Salvatore, M., Xi, YG., Masullo, C. & M. Pocchiari. 1992. Sulphate polyanions prolong the incubation period of scrapie-infected hamsters. *J. Gen. Virol.*, 73 (Pt3): 661-665.

Lehmann, S., Milhavet, O. & A. Mange. 1999. Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomed. Pharmacother.* 53:1, 39-46

Madec, J.Y., Vanier, A., Dorier, A., Berillon, J., Belli, P. & T. Baron. 1997. Biochemical properties of protease resistant prion protein PrP^{Sc} in natural sheep scrapie. *Arch. Virol.*, 142:8, 1603-1612.

Madigan, M.T, Martinko, J.M. & J.Parker. Brock. *Biología de los Microorganismos*. 8ª edic. Prentice Hall. Madrid. 1997.

Mangé, A., Nishida, N., Milhavet, O., McMahon, H.E.M., Casanova, D. & S. Lehmann. 2000. Amphotericin B inhibits the generation of the scrapie isoform of the prion protein in infected cultures. *J. Virol.*, 74:7, 3135-3140

Manuelidis, I. 1997. Decontamination of Creutzfeldt-Jakob Disease and other transmissible agents. *J. Neurovirol.*, 3: 62-65.

Manuelidis, I. 1998. Cleaning CJD-contaminated instruments. *Science*, 281:1961.

Masters, C., 1985. Perspectives on prions. *Nature*, 314: 15-16

Millson, G.C., Hunter, G.D. & R.H. Kimberlin. 1976. The physico-chemical nature of the scrapie agent. In '*Slow virus diseases of animals and man*' Ed. R.H. Kimberlin. Amsterdam. North-Holland.

Mould, D.L., Dawson, A.M. & W. Smith. 1965. Scrapie in mice. The stability of the agent to various suspending media, pH and solvent extraction. *Res. Vet. Sci.*, 6:151-154

Neibergs, H.L., Ryan, A.M., Womack, J.E., Spooner, R.L. & J.L. Williams. 1994. Polymorphism analysis of the prion gene in BSE-affected and unaffected cattle. *Anim. Genet.* 25:5, 313-317

Nishida, N., Harris, D.A., Vilette, D., Laude, H., Frobert, Y., Grassi, J., Casanova, D., Milhavet, OI & S. Lehmann. 2000. Successful transmission of three mouse-adapted scrapie strains to murine neuroblastoma cell lines overexpressing wild-type mouse prion protein. *J. Virol.*, 74:1, 320-325

OMS. Rapport d'une consultation OMS sur les problèmes de santé publique liés aux encéphalopathies spongiformes transmissibles humaines et animales. Genève, Suisse. 2 -3 avril, 1996

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. & Ch. Wesismann. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 40:735-746

Oesch, B., Westaway, D. & S.B. Prusiner. 1991. Prion protein genes: evolutionary and functional aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 172:109-124.

Parchi, P., Castellani, R., Capallari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S.G., Farlow, M., Dickson, D.W., Sima, A.A.F. & G. rojanowski. 1996. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.*, 39:767-778

Pauly, P.C. & D.A. Harris. 1998. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 273:33107-33110

Perrier, V., Wallace, A.C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S.B. & F.E. Cohen. 2000. Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 97:11, 6073-6078

Pocciari, M. 1993. Safety of medicinal products: summary. *Develop. Biolog. Stand.* 80:207-208.

Prescott, L.M., Harley, J.P. & D.A. Klein. Microbiología 4ª edic., McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, 1999

Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 216:136-144

Prusiner, S.B. 1984. Priones. *Invest. Cienc.*, dic., 22-32

Prusiner, S.B. 1984. Prions: novel infectious pathogens. *Adv. Virus Res.*, 29: 1-56

Prusiner, S.B. 1994. Biology and genetics of prion diseases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48:655-686

Prusiner, S.B. 1995. El prion en la patología. *Invest. Cienc.*, marz. 14-21

Prusiner, S.B. 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13363-13383

Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Groth, D.F., Bowman, K.A., Mock, N.I., Cochran, S.P. & F.R. Masiarz. 1981. Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 78:6675-6679.

Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bolton, D.C., Bowman, K.A., Groth, D.F., Cochran, S.P., Hennessey, E.M., Braunfeld, M.B., Baringer, J.R. & M.A. Chatigny. 1984. Prions: Methods for assay, purification and characterization. *Methods in Virology*. VIII: 293-345

Prusiner, S.B. & M.P. McKinley. Prions. Novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob Disease. Academic Press. Inc., San Diego, 1987.

Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Stahl, N. & R. Gabizon. 1993. Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA.* 90:7, 2793-2797

Prusiner, S.B., Scott, M.R. De Armond, S.J. & F.E.Cohen. 1998. Prion protein biology. *Cell.* 93:3, 337-348.

Purdey, M. 1992. Mad cows and warble flies: a link between BSE and organophosphates?. *The Ecologist*, 22:52-57

Raeber, A.J., Brandner, S., Klein, M.A., Benninger, Y., Musahl, C., Frigg, R., Roleckl, C., Fisher, M.B., Weissmann, C. & A. Aguzzi. 1998. Transgenic and knockout mice in research on prion diseases. *Brain Pathol.*, 8:4, 715-733

Rodríguez Ferri, E.F. 1996. Encefalopatías espongiiformes. Priones. Mesa Redonda sobre Encefalopatías espongiiformes. Colegio Oficial de Veterinarios de León-Facultad de Veterinaria. Junio

Rodríguez Ferri. E.F. 1996. Encefalopatía espongiiforme bovina. Etiología y epidemiología. Colegio Oficial de Veterinarios de Zamora. Mesa Redonda. Octubre.

Rodríguez Ferri, E.F. 1998. Riesgos emergentes. Priones. Diplomados en Sanidad (1997-2000).

Rosenberg, R.N., White, C.L., Brown, P., Gajdusek, D.C. Volpe, J.J., Posner, J. & P. Dyck. 1986. Precautions in handling tissues, fluids and other contaminated materials from patients with documented or suspected Creutzfeldt -Jakob disease. *Ann. Neurol.* 19:75-77

Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J., Westway, D. & S.B. Prusiner. 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell.* 59:847-857

Schatz, H.M., Laszlo, L., Holtzman, D.M., Tatzelt, J., DeArmond, S.J., Weiner, R.I., Mobley, W.C. & S.B. Prusiner. 1997. A hypothalamic neuronal cell line persistently infected with scrapie prions exhibits apoptosis. *J. Virol.*, 71:11, 8821-8831

Scholzer, M., Rackwitz, H.R., Gustchina, A., Laco, G.S., Wlodawer, A., Elder, J.H. & S.B. Kent. 1996. Comparative properties of feline immunodeficiency virus (FIV) and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteinases prepared by total chemical synthesis. *Virology* 224(1):268-275

Schreuder B.E., Geertsma, R.E., Van Keulen, L.J., Van Asten, J.A., Enthoven, P., Oberthur, R.C., de Koeijer, A.A. & A.D. Osterhaus. 1998. Studies on the efficacy of hyperbaric rendering procedures in inactivating bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents. *Vet. Rec.*, 142(18):474-480

Shadduck, J.A., Stsorts, R. & L.G. Adams. 1996. Selected examples of emerging and reemerging infectious diseases in animals. *ASM News*. 62:11, 586-588

Shyng, S.L., Heuser, J.E. & D.A. Harris. 1994. A glycolipid-anchored prion protein in endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell. Biol.*, 125:1239-1250

Somerville, R.A., Chong, A. & O.U. Mulqueen. 1997. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*. 386, 564

Somerville, R.A. & L.A. Ritchie, 1990. Differential glycosylation of the protein PrP forming scrapie-associated fibrils. *J. Gen. Virol.*, 4:833-839

Soto, C., Kacsak, R.J., Saborio, G.P., Aucourturier, P., Wisniewski, t., Prelli, F., Kacsak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I. & B. Frangione. B. 2000. Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet*, 355:9199, 192-197.

Supattapone, S., Nguyen, H.O., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. & M.R. Scott. 1999. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 96:14259-14534.

Supattapone, S., Nguyen, H.O., Muramoto, T., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. & M. Scott. 2000. Affinity-tagged miniprion derivatives spontaneously adopt protease-resistance conformations. *J. Virol.*, 74: 24, 11928-11934.

Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., De Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O. & M. Salmona. 2000. Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP^{Sc} *in vitro*. *J. Mol. Biol.*, 300:5, 1309-1322.

Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P., Rocchi, M., Poli, G., Forloni, G., Bandiera, T., Varasi, M., Suarato, A., Cassutti, P., Cervini, M.A., Larsen, J., Salmona, M. & C. Post. 1997. Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science*, 276:5315, 1119-1122.

Taguchi, F., Tamai, Y., Uchida, K., Kitajima, R., Kojima, H., Kawaguchi, T., Ohtani, Y. & S. Miura. 1991. Proposal for a procedure for complete inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Ann. Neurolog.* 24:466-467.

Tamai, Y., Taguchi, F. & S. Miura. 1988. Inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Ann. Neurolog.* 24:466-467

Tateishii, J., Tashima, T. & T. Kitamoto. 1988. Inactivation of the Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Ann. Neurolog.*, 24:466

Tateishi, J., Tashima, T. & T. Kitamoto. 1991. Practical methods for chemical inactivation of Creutzfeldt-Jakob disease pathogen. *Microbiol. Immunol.*, 35:163-166.

Taylor, D.M. 1986. Decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease agent. *Ann. Neurolog.* 20: 749.

Taylor, D.M. 1991. Resistance of the ME7 scrapie agent to peracetic acid. *Vet. Microbiol.*, 27:1, 19-24.

Taylor, D.M. 1995. Survival of mouse-passaged bovine spongiform encephalopathy agent after exposure to paraformaldehyde-lysine-periodate and formic acid. *Vet. Microbiol.*, 44:111-112.

Taylor, D.M. 1996. Transmissible subacute spongiform encephalopathies: practical aspects of agent inactivation. In *Transmissible subacute Spongiform Encephalopathies: Prion Disease*. 3rd Int. Symp. on Subacute Spongiform Encephalop. Prion Diseases. Paris. Eds. L. Court & D. Dodet.

Taylor, D.M. 1996. Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.* 347:1333

Taylor, D.M. 1999. Inactivation of prions by physical and chemical means. *J. Hospital Infect.*, 43 (Suppl.) S69-S76.

Taylor, D.M. 2000. Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents. A review. *Vet. J.*, 159:10-17

Taylor, D.M. & J.E. Bell, 1993. Prevention of iatrogenic transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 341:1543-1544

Taylor, D.M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D.A., Brown, K.L., Lamza, K.A. & G.R.A. Smith. 1994. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Archiv. Virol.*, 139, 313-326

Taylor, D.M., Fernie, K., McConnell, I., Ferguson, C.E. & P. Steele. 1998. Solvent extraction as an adjunct to rendering; the effect on BSE and scrapie agents of hot solvents, followed by dry heat and steam. *Vet. Rec.*, 143: 6-9.

Taylor, D.M., Fernie, K., McConnell, I. & P.J. Steele. 1999. Survival of scrapie agent after exposure to sodium dodecyl sulphate and heat. *Vet. Microbiol.*, 67:13-16.

Taylor, D.M. & I. McConnell, 1988. Autoclaving does not decontaminate formalin-fixed scrapie tissues. *Lancet* i, 1463-1464.

Taylor, D., McConnell, I. & H. Fraser. 1996. Scrapie infection can be established readily through skin scarification in immunocompetent but not immunodeficient mice. *J.Gen.Virol.*, 77:1595-1599

Tiwana, H., Wilson, C., Pirt, J., Cartmell, W., & A. Ebringer. 1999. Autoantibodies to brain components and antibodies to *Acinetobacter calcoaceticus* are present in Bovine Spongiform Encephalopathy. *Infect. Immun.*, 67:6591-6595

Viesl, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E. & H.J.Dyson. 1999. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 96, 2042-2047.

Wadsworth, J.D.F., Hil, A.F., Joiner, S., Jackson, G.S., Clarke, A.R., Collinge, J. 1999. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat. Cell Biol.*, 1:55-59

Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casereno, R.L.B., Prohaska, J.R., Gitlin, J.D. & D.A. Harris. 2000. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chemis.*, 275:11, 7455-7458

Walker, A.S., Inderlied, C.B. & D.T. Kingsbury. 1983. Conditions for the chemical and physical inactivation of the K.Fu. strain of the agent of Creutzfeldt-Jakob disease. *Amer. J. Publ.Health* 73:661-665.

Weissmann, C. 1991. The prion's progress. *Nature*, 349:569-571

Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Dawson, M. & R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121:419-420

Westaway, D., Carlson, G.A. & S.B. Prusiner. 1995. On safari with PrP: prion diseases of animals. *Trends in Microbiol.*, 3:4, 141-147

Wickner, R.B. 1995. Prions of yeast and heat-shock protein 104: 'coprion' and cure. *Trends in Microbiol.*, 3:10, 367-369

Wickner, R.B., Taylor, K.L., Edskes, H.K., Maddelein, M-L., Moriyama, H. & B.T.Roberts. 1999. Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: Protein-Based inheritance. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63:4, 844-861

Wuthrich, K. 1996. Functional implications from a three-dimensional prion protein structure. *Int.Symp.Spongiform Enceph.Georgetown Univ.*,

Xi, YG., Ingrosso, L., Ladogana, A., Masullo, C. & M. Pocchiari. 1992. Amphotericin B treatment dissociates in vivo replication of the scrapie agent from PrP accumulation. *Nature* 356:6370, 598601

ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA. EPIDEMIOLOGÍA Y CLÍNICA

INTRODUCCIÓN. ORIGEN

La EEB fue reconocida y definida como una entidad patológica en noviembre de 1986 (Wells *et al.*, 1987) aunque las investigaciones epidemiológicas y el examen retrospectivo de los cerebros conservados permitió asegurar que los primeros casos tuvieron lugar desde finales de 1984 o comienzos de 1985. La OIE fue informada sobre la EEB en 1988, por primera vez y en 1990 se celebró una reunión especial de expertos en la que se dictaron las primeras recomendaciones sobre la prevención y difusión de la enfermedad. En 1992, la OIE incluyó la EEB dentro de las enfermedades del grupo B y estableció recomendaciones detalladas en el Código Zoosanitario Internacional basadas en las recomendaciones del grupo de expertos al que se ha hecho referencia.

Los estudios epidemiológicos llevados a cabo a partir de 1987 concluyeron identificando como vehículo de la infección a las harinas de carne y hueso incorporadas como fuente proteica a los piensos concentrados que se suministraban en la dieta de los animales (Wilesmith *et al.*, 1988) estimándose, en función de largo periodo de incubación que presenta la enfermedad (entre 4 y 5 años) que la exposición de los bovinos ingleses tuvo que tener lugar a comienzos de los años ochenta o finales de los setenta.

Las investigaciones epidemiológicas indicaron que se trataba de una epidemia con un origen común y en la que los casos de animales afectados eran primarios. Del igual modo, considerando la similitud con el prurito lumbar ovino (*scrapie*) se llegó a la conclusión que el origen más probable debía ser esa enfermedad de las ovejas y que, además, la mayoría de los casos de EEB fueron el resultado del reciclado de tejidos de ganado bovino infectado, a través de las harinas, dentro de la población bovina (Wilesmith *et al.*, 1991; Wilesmith y Wells, 1991), aunque a decir verdad, la procedencia exacta del prión infeccioso causante de la EEB, no se conoce. En la práctica, se han formulado diversas explicaciones sobre el origen.

- La hipótesis más convincente, en términos epidemiológicos, sostiene que el origen de la EEB es el *scrapie* ovino. Si se tiene en cuenta la coincidencia de un alto censo ovino, una incidencia (también alta) de prurito lumbar o tembladera ovina (alrededor de 250 - 260 rebaños positivos al año) y el alto contenido de proteínas de origen ovino en las harinas de carne y huesos al iniciarse la epidemia, la explicación parece clara.

- No puede descartarse que la enfermedad existiera antes en el ganado bovino, con una incidencia muy pequeña, y presentación rara, ni tampoco podría ser ajeno que, como en el caso del ovino, restos bovinos conteniendo el prión infeccioso, formaran parte de las harinas de carne y hueso, desde el principio amplificando el propio efecto, como se ha señalado antes.

- También se ha señalado la coincidencia de que el Reino Unido importó harinas de carne y huesos de rumiantes africanos, lo que podría representar una nueva opción, en este caso importada, aunque a esta se le presta la menor credibilidad.

FACTORES RELACIONADOS CON LA APARICIÓN DE LA EEB

Los cambios introducidos en la fabricación industrial de las harinas de carne y huesos en el Reino Unido, propiciados a comienzos de los años ochenta por el incremento de los precios del petróleo, se consideran la causa de la emergencia de la EEB.

El proceso tradicional de tratamiento de los despojos de matadero y cadáveres de animales, incluía un primer tratamiento térmico de 1 -2 horas a 140°C seguido de un tratamiento químico con hexano o pentano (derivados del petróleo) a 70°C y 8 horas. Más tarde se recuperaba el disolvente y se obtenían grasas, por un lado, y harinas de carne y de hueso, por otro. Como consecuencia del incremento de los precios del petróleo a comienzos de los años ochenta, se buscó abaratar el procedimiento modificando los tratamientos. A tal efecto, se suprimió el uso de los disolventes en un nuevo sistema que incorporaba tan solo un tratamiento térmico en un generador de vapor a 100-140°C durante 10 a 60 minutos, completados con el uso de centrifugas para la separación de las grasas. Hoy sabemos que ambos tratamientos conjuntos (disolventes y calor) reducían la infectividad de las proteínas infecciosas, hasta anularla, pero al suprimir el tratamiento químico no solo la infectividad permanecía, sino que probablemente se concentró.

Los datos epidemiológicos y los resultados de investigaciones llevadas a cabo con posterioridad parecen indicar que los bovinos habían estado expuestos al agente, como consecuencia del cambio tecnológico en el tratamiento de las harinas, desde finales de los años setenta y, particularmente en la primera mitad de los ochenta. A tal efecto se llevaron a cabo estudios de simulación por ordenador concluyendo que en 1981-82, la exposición fue suficiente para provocar la enfermedad clínica (Wilesmith *et al.*, 1988,1991, 1992).

INCIDENCIA

Los estudios epidemiológicos realizados a partir de 1987 revelaron que la mayoría de los animales infectados se contaminaron siendo jóvenes y que la aptitud más representada entre los enfermos incluía animales de producción láctea (Wilesmith *et al.*, 1988), hasta el punto de que en un balance estadístico de finales de 1997, se pone de manifiesto que el 60'33% de las explotaciones lecheras y el 16% de las dedicadas a la reproducción (vacas nodrizas) habían registrado, al menos, 1 caso de EEB. De entre éstas últimas, más del 80% de los casos correspondía a vacas procedentes de explotaciones lecheras en las que, con toda probabilidad, se habían infectado en el pasado.

La edad de máxima incidencia se situó entre los 4 y 5 años de edad, circunstancia que considerando la duración establecida para el periodo de incubación, justifica la afirmación realizada de que los animales se infectaron de jóvenes. En cualquier caso, el periodo medio de incubación se sitúa en torno a los 5 años (Pearson *et al.*, 1993) sin que pueda descartarse que se prolongue toda la vida del animal (Bradley y Wilesmith, 1994). El caso más joven corresponde a un animal de 20 meses.

En conjunto, puede afirmarse que la incidencia de la EEB en el UK, ha sido baja, pues la cifra media puede situarse en torno a 10 casos/año, en fase clínica, por 1.000 bovinos adultos. Como se ha señalado, el número de casos de animales enfermos fue progresando a partir de 1986 de forma creciente. La curva epidémica alcanzó su punto álgido en el año 1992 y en 1993 el número de casos comenzó a descender, pero en la franja que comprende los meses de octubre de 1992 a marzo de 1993, ambos incluidos, se diagnosticaron 20.158 casos, lo que equivale a una media de 3.359 casos mensuales, el nivel más alto de toda la epidemia. A partir de 1992, año en que se diagnosticaron 37.280 casos, que suponen una media por semana de 716'9 casos, la incidencia anual de la enfermedad ha ido

disminuyendo progresivamente. En el año 2000 se diagnosticaron en el Reino Unido un total de 2.040 casos y hasta la fecha del 2001 (24 de abril) se llevan diagnosticados un total de 280 casos (OIE).

Como es sabido, en el año 1988 se prohibió en el Reino Unido la alimentación de bovinos con harinas de rumiantes, medida que se amplió en el año 1994 con la prohibición de la alimentación de los rumiantes con harinas de mamíferos en todos los países de la Unión Europea (Decisión 94/381 de la Comisión). La repercusión de la medida de prohibición adoptada en 1988 repercutió en el descenso progresivo del número de casos a partir de 1993 y se considera que la mayoría de los casos de EEB en bovinos nacidos después de 1988 tienen su origen en la contaminación cruzada de los alimentos para rumiantes a partir de harinas de carne y hueso contaminadas, elaboradas en las mismas plantas de fabricación, o bien a la presencia directa de estas en los alimentos, incumpliendo las normas adoptadas.

En el año 1996, coincidiendo con la primera sospecha de relación entre la EEB y la ECJ, se procedió al embargo comercial del Reino Unido con el resto de los países de la UE y a la recogida de todos los restos de piensos existentes, tanto en las fábricas de piensos como en las explotaciones animales, con el fin de evitar futuras contaminaciones.

Tabla 5. EEB en el Reino Unido (OIE)

AÑO	Gran Bretaña	Irlanda del Norte	Total Reino Unido
1987 y antes	446	0	446
1988	2.510	4	2.514
1989	7.199	29	7.228
1990	14.294	113	14.407
1991	25.189	170	25.359
1992	36.906	374	37.280
1993	34.631	459	35.090
1994	24.091	345	24.436
1995	14.389	173	14.562
1996	8.075	74	8.149
1997	4.370	23	4.393
1998	3.217	18	3.235
1999	2.294	7	2.301
2000			2.040
2001			280
Totales			184.213

Una de las principales características epidemiológicas de la EEB observadas en el Reino Unido, fue la baja incidencia de casos por rebaño. En 1992, coincidiendo con la crisis más importante de la enfermedad, se dio también la máxima incidencia media anual registrada, que fue del 2,7%. Si bien hubo rebaños con gran número de casos, en algunos hasta más de 100, en el 74% de los afectados se observaron 5 casos o menos, y en un 35% solamente uno (a finales de 1989, por ejemplo, 4.329 explotaciones de un total de 6.841 afectadas, solo habían presentado un caso –Mattews, 1990-). Así mismo, los estudios epidemiológicos revelaron que la mayoría de los bovinos enfermos de la EEB se contaminaron siendo jóvenes, y que la mayoría de los afectados correspondían a animales adultos, especialmente vacas de producción lechera (la incidencia entre el 1 de abril de 1985 y el 31 de marzo de 1988 fue del 0'69% en el caso de la cabaña lechera, mientras que fue tan solo del 0'02% entre los animales de carne). Todos los casos tuvieron lugar en vacas adultas, excepto un caso confirmado y otros sospechoso, en machos adultos. El primer caso confirmado en un semental se describió en 1988 en Escocia (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

La explicación de esta baja incidencia por explotación se ha ofrecido desde distintas versiones, que tienen que ver con los cálculos de la hipotética cantidad de material infeccioso que un animal en particular (de un conjunto de animales de una explotación)

podría haber recibido con la alimentación y ser la causa de su contagio. Como se ha señalado (Informe Phillips), la dosis efectiva depende tanto de la cantidad de material infeccioso como del grado de infecciosidad de ese material y, a este respecto debe considerarse que son el cerebro y la médula espinal de los animales afectados y, muy especialmente, al final del periodo de incubación o en pleno curso clínico de la enfermedad, los que concentran la mayor cantidad de material infectivo. La cuestión clave, por tanto, tiene que ver con la cantidad ingerida de tales materiales y procedente de esas condiciones. En otro lugar nos hemos referido ya, a la infectividad titulada de esos materiales.

Para poder concluir acerca del riesgo preciso de la situación (es decir cantidad consumida de tejido de alta infectividad como cerebro y médula espinal) hay que considerar, por un lado, que esos tejidos infecciosos en el curso del procesado de las harinas se diluyen con el resto de los tejidos del animal (no infecciosos) y lo vuelven a hacer nuevamente al mezclarse con los despojos y cadáveres de otros animales, entre los cuales los habrá infectados y no infectados, e incluso ese material (harinas) vuelve a diluirse al formularse como parte de los piensos concentrados (eso supone entre el 2 y el 4% de la dieta en animales adultos y hasta un 5% en los terneros). Es decir que un hipotético material infectivo, procedente de un cadáver fallecido como consecuencia de la enfermedad o sacrificado al final del periodo de incubación o con síntomas pero no diagnosticado, es diluido al menos dos veces y tal vez tres antes de ingresar con la dieta de un animal. En estas condiciones, existen o pueden existir, diferencias notables en el riesgo de que dos animales de una misma explotación, alimentados con suplementos proteicos procedentes de un mismo lote de harinas, consuman simultáneamente material infeccioso. Pueden hacerlo, pero también pueden no hacerlo, es decir que la distribución de los tejidos más infecciosos dentro de las harinas no es homogénea lo que hace que algunos animales se expongan a niveles más altos del agente infeccioso que otros. Esta teoría, conocida como 'teoría packet' de distribución del riesgo de las harinas, fue propuesta en 1991 (Wilesmith, 1991; Wilesmith & Atkinson, 1991). Ello explicaría que en las explotaciones donde se han diagnosticado casos de EEB la incidencia no sigue una cifra lógica y, muy a menudo, no se diagnostican más casos, aunque la explicación posee una parte muy imprecisa que se refiere al desconocimiento real del título del animal o animales concretos que entraron a formar parte de la materia prima para las harinas, pues se sigue admitiendo (Kimberlin y Wilesmith, 1994) que pequeñas cantidades de material infeccioso de alto título pueden ser suficientes para transmitir oralmente la enfermedad (Informe Phillips).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

Como se ha señalado repetidamente, en 1986 apareció la EEB y en 1989 se diagnosticaron los primeros casos en Irlanda, a partir de vacas importadas del Reino Unido, aunque ya a finales de aquél año se registraron los primeros casos autóctonos. En 1990 se describieron los primeros casos, primero en Portugal y Suiza y, a finales de año, también en Francia. En 1997 se diagnosticaron por primera vez casos en Holanda, Bélgica y Luxemburgo, en Liechtenstein en 1998 y en Dinamarca, España y Alemania en el 2000, siendo Italia la última en incorporarse a la lista, en el curso del presente año.

La EEB presenta, por tanto, en la actualidad, una distribución europea (ver tabla). Según puede verse, a partir de datos recogidos por la OIE, Portugal, Suiza, Irlanda y Francia, son los países que contabilizan, en conjunto, el 84'6% del total de casos descritos fuera de UK. En Portugal, la incidencia se ha estabilizado desde mediados de 1999; sin embargo, ha aumentado en el año 2000 respecto al año 1999, en el caso de Francia (de 31 a 162), de Bélgica (de 3 a 9) y, también, en el caso de Irlanda (de 91 a 149). Dinamarca, Alemania y España declararon, por primera vez, la enfermedad en animales nacidos en los respectivos países en el año 2000 y, especialmente Alemania y España han incrementado sustancialmente el número de casos en lo que llevamos del año 2001. Cinco estados de la UE, Italia, Finlandia, Suecia, Grecia y Austria, no habían declarado la enfermedad en animales autóctonos hasta finales del 2000.

Con la obligatoriedad de las pruebas de diagnóstico *post mortem* se espera un aumento del número de casos detectados en todos los estados miembros.

Tabla 6. Casos de EEB fuera del Reino Unido (OIE)

Año	Alema-nia	Bélgica	Dinamarca	España	Francia	Irlanda	Liechtenstein	Luxemburgo	Holanda	Portugal	Suiza	Total
89						15						15
90						14				1	2	17
91					5	17				1	8	31
92	1 ⁽¹⁾		1			18		1		1	15	36
93					1	16				3	29	49
94	3				4	19				12	64	102
95					3	16				14	68	101
96					12	73				29	45	159
97	2	1			6	80		1	2	30	38	160
98		6			18	83	2		2	106	14	231
99		3			31	91			2	159	50	347
00	7	9	1	2	162	149			2	150	33	401
01	64	13	2	44	81	51			8	37		315
Tota	77	32	4	46	323	647	2	2	16	543	366	1.964

(1): Hasta el 2000, los casos de Alemania eran importados, igual que sucedió en Dinamarca o Portugal, a partir de 1994; los datos del 2001 se refieren hasta el 24 de abril

LA SITUACIÓN EN ESPAÑA

El primer caso de EEB en España se confirmó el 22 de noviembre del pasado año en un animal de la provincia de Lugo (Carballedo) de algo más de 5 años (66 meses). Desde entonces se han diagnosticado a fecha de hoy un total de 46 casos (<http://www.eeb.es>), cuya distribución por CC.AA. se refleja en el cuadro siguiente.

Tabla 7. Distribución, por CC.AA. de 46 casos confirmados de EEB en España

Comunidad Autónoma	Núm. de casos	Fecha del primer caso
Galicia	21	22. Noviembre 2000
Castilla y León	9	5. Enero 2001
Asturias	4	19. Enero. 2001
Navarra	5	5. Febrero. 2001
Baleares	3	14. Febrero. 2001
País Vasco	1	14. Febrero. 2001
Cataluña	2	30. Marzo. 2001
Castilla-La Mancha	1	14. Mayo. 2001

En lo que hace referencia al número de casos por CC.AA. y datos que se refieren a edades de los animales, se incluyen a continuación.

Tabla 8. Casos de EEB por CC.AA. distribución por edades

CC.AA.	Núm de casos	Edad media meses	Desviación estándar	Edad media años	Desviación estándar
Galicia	21	75'38	±20'46	6'23	±1'7
Castilla y León	9	65'89	±10'26	5'48	±0'86
Asturias	4	94'25	±56'18	7'85	±4'68
Navarra	5	75'4	±16'21	6'28	±1'35
Baleares	3	97'67	±35'57	8'05	±2'87
País Vasco	1	47	±0	3'9	±0
Cataluña	2	67	±5'66	5'58	±0'46
Castilla La Mancha	1	69	±0	5'75	±0
TOTAL	46	75'5	±24'5	6'26	±2'03

La ordenación de las provincias, dentro de las CC.AA. coloca en primer lugar a Lugo, con 12 casos (26'08% del total) seguido de La Coruña con 6 casos (14'28% del total), León y Navarra con 5 casos cada una (individualmente el 10'86% del total), Asturias con 4 casos (el 8'69% del total), Orense, Zamora, Menorca y Barcelona con 2 casos cada una (4'34% del

total) y con un solo caso las provincias de Pontevedra, Avila, Palencia, Mallorca, Guipúzcoa y Toledo (individualmente un 2'17% del total).

El análisis relativo de las positividades obtenidas hasta la fecha debe hacerse considerando la situación que refiere el número de diagnósticos realizados. A este respecto, la tabla recoge las pruebas realizadas dentro de cada CC.AA. según se desprende de la información publicada 'on line' por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (<http://www.eeb.es>).

Tabla 9. EEB en España. Diagnósticos realizados por CC.AA.

CC.AA.	Diagnósticos realizados	Positivos	% sobre el total
Andalucía	6.209	0	0'00
Aragón	1.525	0	0'00
Asturias	6.450	4	0'06
Baleares	274	3	1'09
Canarias	997	0	0'00
Cantabria	10.103	0	0'00
Castilla La Mancha	3.102	1	0'03
Castilla y León	15.491*	9	0'05
Cataluña	3.240	2	0'06
Extremadura	1.861	0	0'00
Galicia	37.745	21	0'05
La Rioja	356	0	0'00
Madrid	4.558	0	0'00
Navarra	1.130	5	0'44
País Vasco	9.526	1	0'01
Murcia	834	0	0'00
C. Valenciana	1.150	0	0'00
Ceuta	7	0	0'00
Melilla	0	0	0'00
Total	104.558	46	0'04

*: hasta el 30 de mayo incluyen 16.290 (Lozano, 2001)

Se puede observar, así, que de las 8 autonomías que han declarado casos, los niveles de positividad relativa más altos obtenidos se han alcanzado en Baleares (especialmente, superándose el 1%, aunque el número de diagnósticos realizados es bajo) y Navarra (con un 4'4 de animales positivos por 1.000 diagnósticos realizados). En el resto, los niveles de

positividad oscilan entre 1 caso por 10.000 (en el caso del País Vasco) y 6 por 10.000 en el caso de Asturias. La media nacional se sitúa en 4 casos por 10.000 diagnósticos realizados.

La frecuencia de casos por raza coloca a la Frisona en primer lugar (27 casos, que suponen el 58'69% del total), seguido de los cruces (12 casos que suponen el 26'08% del total) y cantidades menores en otras razas como Parda Alpina o Pirenaica (2 casos en ambos, que suponen individualmente un 4'34% del total) y Simmental y Limousina (1 caso cada una que representan, individualmente un 2'17% del total).

Finalmente, en la tabla, se recoge la distribución por meses de su descripción en nuestro país

Tabla 10. EEB en España. Secuencia temporal de positivos

Mes	Número de casos
Noviembre 2000	1
Diciembre 2000	1
Enero 2001	10
Febrero 2001	20
Marzo 2001	6
Abril 2001	6
Mayo 2001	1

Como puede observarse, después de una subida, manifiesta en los meses de enero y febrero de este año, se ha producido una recesión que se mantiene en los 3 últimos meses.

CASTILLA Y LEÓN: El caso particular de Castilla y León, en el contexto nacional pone de manifiesto la presencia de 9 casos, que representan el 19'56% del total y valorando la cifra de forma relativa, atendiendo al número de diagnósticos realizados, resulta un valor de 5 casos por 10.000 diagnósticos, ligeramente superior a la media nacional. La provincia con mayor número de casos descritos hasta la fecha es León, con un total de 5 casos, seguida de Zamora con 2 y 1 caso en cada una de las de Palencia y Avila.

Hasta el momento, cinco provincias de la C.A., no han descrito casos positivos (Burgos, Segovia, Soria, Salamanca y Valladolid) aunque hay que señalar que en las cuatro

primeras, con casos positivos, se concentra un 69'9% % del total del censo bovino lechero autonómico, según el censo del Ministerio de Agricultura, aptitud más relacionada con la presencia de la enfermedad. Respecto del grupo de animales mayores de 2 años con destino a sacrificio u otras aptitudes (no ordeño), la representación de las provincias con positivos sobre el total autonómico asciende al 26'27%.

La mayoría de los animales positivos pertenecían a la raza frisona (7 sobre 9, lo que representa el 77'7%) y los dos restantes se repartieron entre un animal de raza parda y otro era un cruce. Como se ha señalado, la media de edad se situó en torno a los cinco años y medio siendo el animal más joven el diagnosticado en la provincia de Avila (Martínherrero) con 56 meses (4'66 años) y el más viejo uno de los cinco diagnosticados en la provincia de León (Crémenes) que tenía 84 meses (7 años) en el momento del diagnóstico. La concentración temporal de casos se produjo en el mes de enero (4 casos) y febrero (3 casos) mientras que en el mes de marzo no se diagnosticó ninguno y en el de abril se diagnosticaron 2 casos más.

En lo que se refiere al número de análisis efectuados hasta la fecha, 15.491 (16.29 hasta el 31 de mayo), representan la segunda partida por orden de importancia, de entre todas las CC.AA., aunque bien es verdad que Castilla y León totaliza el mayor censo bovino a nivel nacional. Según datos de la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León (Lozano, 2001), un total de 14.585 muestras (el 89'5%) corresponden a sacrificios de animales con destino a la cadena alimentaria y 1.705 (el 10'46%) corresponden a muestras de animales muertos en las explotaciones o a sacrificios obligatorios (de urgencia). Del total de muestras, 130 fueron estudiadas en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de León, 5 de ellas como confirmación diagnóstica, después de la realización de la prueba rápida preceptiva (Lozano, 2001).

RANGO DE HOSPEDADORES

Como se ha señalado, las ETTs han sido descritas en muchos animales mantenidos en cautividad o en semilibertad, en zoos o en reservas, pertenecientes a especies de las familias *Felidae* y *Bovidae* y, también, en monos. Entre los primeros, la EE del gato doméstico está causada por el prión infeccioso de la EEB y su presunto origen es similar al de otros casos observados en pumas (*Felix concolor*), guepardos (*Acinonyx jubatus*), tigres (*Phantera tigris*), ocelotes (*Felis pardalis*) y leones (*Phantera leo*).

Entre las especies de la familia *Bovidae*, se han descrito casos de EE en el nyala (*Tragelaphus angasi*) y gran kudú (*Tragelaphus strepsiceros*), también originados por el prión infeccioso de la EEB y origen semejante para los casos observados en elans del Cabo (*Taurotragus oryx*), oryx del cabo (*Oryx gazella*), oryx de Arabia (*Oryx leucoryx*), oryx blancos (*Oryx dammah*) y bisontes (*Bison bison*). Finalmente se han descrito también en distintas especies de lemures y macacos, de monos no antropoides. En todas estas especies la vía de transmisión más probable ha sido por alimentos contaminados. En los bóvidos de zoo, la incidencia de la enfermedad es más alta que la de la EEB, además de un menor período de incubación, una aparición a menor edad y con un curso clínico más corto (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

En condiciones experimentales la EEB se ha logrado transmitir a distintas especies animales, hospedadores naturales o experimentales, mediante inoculación por vía parenteral o intracerebral, ocasionalmente por vía intravenosa o intraperitoneal, a la oveja, cabra, cerdo, ratón, visón, mono (mono ardilla, tití y macaco). Por vía digestiva se ha transmitido a la oveja, cabra, ratón, lemur y visón. A este respecto poseen interés especial la oveja y la cabra quienes pueden haber estado expuestos a los mismos riesgos que los bovinos y en los que se ha demostrado, también, la capacidad experimental de infectarse a través de la sangre (Fisher *et al.*, 2000).

Entre las especies que no son sensibles a la infección, al menos en el primer pase se incluye el criceto, si bien este animal padece la enfermedad tras un pase por ratón. Hasta la fecha, tampoco se ha podido reproducir la enfermedad en la gallina por vía parenteral y digestiva ni en el cerdo por vía digestiva.

INFECCIOSIDAD DE LOS TEJIDOS

Como se ha señalado en otro lugar, cuanto se refiere a la patogénesis e infectividad en la EEB mantiene aún muchos puntos oscuros, siendo su interés muy alto tanto desde el punto de vista científico como práctico. Con el fin de identificar los tejidos que mantienen y concentran infectividad en los animales enfermos, se llevó a cabo un estudio (SEAC, 1997; Wells *et al.*, 1994, 1996, 1998) en el que se provocó la infección experimental mediante la administración, por vía oral, de 100 gramos de homogeneizados de cerebros de animales enfermos, a terneros de 4 meses de edad. Esta dosis se estima que es de 10 a 100 veces superior a la dosis a la que habían estado expuestos animales que padecieron la enfermedad en el curso de la epidemia. Más adelante, los terneros infectados se fueron

sacrificando secuencialmente en distintos períodos postinfección, recogiendo de cada uno un total de 46 muestras distintas, procedentes de diferentes tejidos, secreciones y excreciones. Con ellas se procedió a la inoculación intracerebral o intraperitoneal en ratones, con el fin de comprobar su infectividad. El estudio tuvo una duración de 40 meses y los resultados pueden resumirse en el cuadro siguiente:

Tabla 11. Tiempo de detección de la infecciosidad en la infección experimental

Periodo	Detección de Infecciosidad	Observaciones
Antes de los 6 meses post-infección	Ninguna	
Entre los 6 y los 18 meses post-infección	Detección a nivel del intestino delgado, en el ileon distal	Posiblemente ligada al tejido linforreticular de las placas de Peyer
Entre los 18 meses y 3 meses previos a la aparición de manifestaciones clínicas	No se detectó infecciosidad a ningún nivel	
3 meses previos a la aparición de manifestaciones clínicas (signos neurológicos)	Se detectó infecciosidad a nivel de cerebro, médula espinal, ganglio trigémino, retina y raíces de los ganglios raquídeos.	
Animales con síntomas claros	Infecciosidad en los niveles anteriores y débil infecciosidad en la médula ósea	

Este bioensayo en ratón para la detección de la infectividad de los tejidos ha sido puesto en entredicho debido a la 'barrera de especie' entre el ganado bovino y el ratón, pues se ha cuantificado que el ratón es 1.000 menos sensible que los bovinos. Debe señalarse, sin embargo, que en este estudio, la inoculación del ratón se llevó a cabo por vía intracerebral y que esta vía es entre 100 y 100.000 veces más sensible que la vía oral, que representa la ruta de entrada principal del prión infeccioso en el organismo.

No se ha detectado infecciosidad a partir de homogeneizados de ganglios linfáticos y de bazo procedentes de vacas infectadas, ni de vacas enfermas de EEB, pues los animales inoculados no desarrollaron la enfermedad. En el caso del *scrapie*, sin embargo, el prión infeccioso sí que se detecta en estos órganos, incluso en distintas fases del período de incubación de la enfermedad. En el supuesto, no demostrado, de que existiera infectividad en el bazo o en los ganglios linfáticos de los bovinos, esta sería aproximadamente 100.000

veces inferior a la del encéfalo y cualquier otra infecciosidad presente en los tejidos, incluido el músculo, sería aún menor. En la lista que se acompaña, se enumeran los distintos tejidos de los animales enfermos, en los que no se pudo demostrar infectividad alguna, mediante inoculación en ratones.

- Piel
- Grasa.
- Sangre (células blancas sanguíneas, coágulo sanguíneo, suero fetal bovino, suero).
- Líquido cerebroespinal.
- Tracto gastrointestinal (esófago, rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado proximal, colon distal y proximal y recto).
- Corazón, riñón, hígado, tráquea, pulmón, bazo, páncreas, tonsilas, ganglios linfáticos (mesentéricos, prefemorales y retrofaríngeos).
- Músculo (diafragmático, semitendinoso, masetero y longísimo).
- Nervios (cola de caballo, ciático proximal, esplénico y tibial).
- Aparato reproductor de la hembra (ovario, cotiledones placentarios, carúncula uterina, líquidos amniótico y alantoideo, mama y leche).
- Aparato reproductor del macho (epidídimo, próstata, semen, vesícula seminales y testículo)

TRANSMISIÓN

Se admite, sin reservas, que la EEB se transmitió a los bovinos por vía digestiva, mediante el consumo de piensos concentrados que incorporaban harinas de carne y huesos elaboradas a partir de rumiantes, contaminadas con priones infecciosos. Tal conclusión se desprende de los estudios llevados a cabo a partir de casos testigo, con animales nacidos después del 30 de octubre de 1988 (Hoinville *et al.*, 1995; MAFF, 1997) y de multitud de casos de infecciones experimentales por esta vía (Barlow y Middleton, 1990; Bradley, 1990; Foster *et al.*, 1993, 1996; Middleton y Barlow, 1993; Robinson *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 1996). En la práctica es preciso reconocer, sin embargo, que esta vía no es la más adecuada para la transmisión de la EEB, sobre todo si se compara con la ruta parenteral, habiéndose estimado que en el ratón, por ejemplo, la dosis de sustancia cerebral bovina infectada, que resulta necesaria para provocar la enfermedad, es 2×10^5 veces mayor por vía oral que por vía intracerebral (Kimberlin, 1994; Middleton y Barlow, 1993), aunque en las evaluaciones de riesgo se atribuye mayor eficacia a la vía oral considerando el interés que posee desde el punto de vista de la salud pública.

Los riesgos de transmisión horizontal desde animales enfermos a otros sanos susceptibles (bien mediante el contacto con animales enfermos o con su ambiente contaminado, por ejemplo pastos) parecen descartados por el momento y aunque hasta la fecha no se ha registrado ningún caso de transmisión iatrogénica, a semejanza de lo demostrado en el caso del hombre con la ECJ clásica, esta vía es factible y no debe descartarse.

No se ha demostrado transmisión por inseminación artificial ni por monta natural desde sementales enfermos, ni mediante el trasplante de embriones.

La transmisión maternal se entiende que corresponde a la transmisión de la madre al feto, en el útero y/o de la vaca al recién nacido a través de la leche o el calostro. En estudios llevados a cabo administrando oralmente a ratones susceptibles placenta procedente de casos de EEB, no se detectó ninguna infecciosidad (Barlow y Middleton, 1990; Bradley, 1990; Middleton y Barlow, 1993), ni tampoco cuando se inocularon extractos de placenta, líquido placentario, ovarios o carúnculas uterinas (Bradley, 1994; MAFF, 1997); tampoco se obtuvo éxito en la transmisión en bovinos expuestos oral y nasalmente a placentas infectadas (Bradley, 1994; MAFF, 1997). A diferencia de esto, en el prurito lumbar ovino sí puede transmitirse la enfermedad a otros ovinos y caprinos con placenta procedente de

animales enfermos y, en condiciones de campo, éste es un hecho común cuando ovejas o cabras paren o abortan y los materiales del aborto son mordisqueados por otras ovejas o cabras del rebaño.

La incidencia de la EEB en la descendencia de los casos confirmados, no es mayor que la que se observaría si los alimentos fuesen la única fuente de infección (Bradley, 1994; MAFF, 1997, Bradley y Wilesmith, 1994). En un estudio de cohorte, que se prolongó por un periodo de 7 años, y en el que se investigó la presentación e incidencia de la enfermedad en 316 terneros nacidos de vacas infectadas de EEB y en otros 316 terneros nacidos de vacas libres de la enfermedad (testigos), procedentes de la misma granja y pertenecientes al mismo grupo de edad, se señaló un riesgo de transmisión maternal del 10% (Curnovet *al.*, 1997; Donnelly *et al.*, 1997; Wilesmith *et al.*, 1997), aunque algunos de esos autores sostienen la idea de que el riesgo de transmisión sea aún mayor (Donnelly *et al.*, 1997). Así mismo, se observó que el riesgo era más alto en el caso de los terneros nacidos después de la presentación de los signos clínicos en su madre, mientras que para los terneros nacidos antes de que la madre presentara signos clínicos, el riesgo disminuía de forma drástica y progresiva. La mejor explicación que se da a estos resultados sostiene la posibilidad de una combinación de una causa genética, en términos de una mayor susceptibilidad y de una auténtica transmisión, según se desprende de estudios de modelización, por ordenador, aunque hasta la fecha una conclusión clara no ha sido establecida.

Sin embargo, cuando se consideraron una serie de factores correctores, de tipo epidemiológico, la incidencia de la transmisión maternal real, en condiciones de campo, se rebajó hasta el 1%. No obstante, sea cual fuere el riesgo, del 1% o del 10%, esta forma de transmisión parece jugar escaso papel epidemiológico en el mantenimiento de la epidemia.

En la transmisión interespecífica de las EETs, además de la barrera de especie, a la que ya nos hemos referido, existen otros factores importantes que condicionan la difusión. Se incluye, por un lado la vía de infección, pues la más eficaz es la vía intracerebral, aunque otros procedimientos son también eficaces a dosis convenientes, por ejemplo son necesarias dosis entre 10^2 y 10^5 veces superiores cuando se utiliza, en el ratón, la vía digestiva. La dosis es otro parámetro que se relaciona directamente con la concentración de priones infecciosos y con la cantidad de material infectivo ingerido o inoculado y, a este respecto, por razones ya aludidas el encéfalo (especialmente tálamo e hipotálamo) y la médula espinal, concentran la mayor parte de la actividad infectiva y de modo particular en animales con síntomas clínicos.

DOSIS

La dosis infecciosa depende de la relación peso/volumen de tejido y del título de infecciosidad por unidad de peso/volumen, condicionando (dentro de ciertos límites) la duración del periodo de incubación, pues a mayor dosis corresponde un periodo de incubación más corto.

Como se ha señalado ya, los datos de diversos estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la edad media de aparición de la enfermedad clínica ha sido en el Reino Unido de 5 años, si bien la franja que recoge la mayoría de los casos va desde 3 a 6 años, pudiendo ampliarse desde 20 meses a 18 años o toda la vida del animal (ver antes) situaciones que deberían corresponder a contagios de individuos adultos (contrariamente a la situación mayoritaria, que corresponde a animales infectados de jóvenes). En condiciones experimentales, cuando se administró a bovinos por vía oral 100 g de cerebro procedente de animales infectados, el periodo mínimo para la aparición de síntomas fue de 35 meses (Wells *et al.*, 1996) y variando la dosis hasta 1 g de cerebro, el periodo de incubación fue mas largo (Anderson *et al.*, 1996), demostrando también de forma directa la importancia de la dosis en el tiempo de aparición de signos de la enfermedad.

PATOGENIA

Se conoce la vía de entrada y, con excepción de los órganos anteriormente señalados, no ha sido identificado el príon infeccioso en ningún otro lugar del organismo; no obstante, se ha descrito infecciosidad en las tonsilas de los enfermos humanos y se sabe también que en el ratón, el tejido linfoide está implicado en el pase de la infectividad desde el intestino al cerebro, lo que sugiere la posibilidad que los linfocitos circulantes transporten al agente infeccioso en la sangre y posteriormente se propague al sistema nervioso central por vía neuronal.

CUADRO CLÍNICO

El período de incubación es muy variable y puede oscilar entre 2 y 8 años e, incluso no se descartan periodos más largos, aunque la cifra media que se propone oscila en torno a los 60 meses. La edad modal de presentación se sitúa entre los 4 y 5 años de edad con extremos observados que van desde los 20 meses hasta los 15 años de edad.

El curso clínico es prolongado, progresivo y mortal con una duración media de 1 a 2 meses y un margen de variabilidad desde que se produce la presentación de los signos clínicos iniciales hasta la muerte del animal, que va desde 7 días hasta un año. Existe una constelación de signos clínicos con alteraciones del comportamiento, sensorio, postura y movimiento, que pueden variar de día a día pero que son progresivos a lo largo de tiempo (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

Los signos neurológicos principales incluyen un comportamiento temeroso o receloso, hiperestesia y ataxia, y al menos uno de ellos, se presenta en el 97% de los casos. Los principales cambios en el comportamiento del animal, descritos hasta la fecha, incluyen temor o recelo, oposición a la entrada en la sala de ordeño, reacciones violentas ante prácticas de manejo habituales como coces cuando se les maipula, especialmente en el ordeño, resistencia, nerviosismo al atravesar puertas o pasos, desorientación y fijación de la mirada por largos períodos de tiempo, movimiento frecuente de las orejas temblorosas o disposición de las mismas hacia atrás, rechinar de dientes, y en el pasto se mantienen a distancia de otros animales, pudiendo patear el suelo. Después de varias semanas, algunos animales manifiestan una agresividad más acentuada.

La hiperestesia, es decir una reacción exagerada ante cualquier tipo de estímulo, y particularmente los sonoros, es una constante observada. También puede apreciarse constante y excesivo lameteo del hocico y flancos, respiración dificultada, movimientos laterales de la cabeza cuando se toca el cuello y presión o restregamiento de la cabeza contra objetos.

Los signos clínicos más frecuentes, que afectan a la locomoción o posturales, incluyen alteraciones locomotoras con incoordinación de movimientos de las extremidades traseras, hipermetría, dificultad de giro, marcha insegua y con muchos traspies, siendo frecuentes las caídas y la dificultad al levantarse. También se observan, con relativa frecuencia, posturas anormales de la cabeza, temblores y mioclonias .

En cualquier caso, la presentación e intensidad de los signos clínicos varía mucho dependiendo de caso, probablemente como consecuencia de la gravedad e intensidad de las lesiones y de la concentración de proteínas infecciosas. Cuando comienza el cuadro clínico en una alta proporción de casos se presenta pérdida de la condición corporal y disminución de la producción láctea.

En un estudio de frecuencia de presentación de los primeros signos clínicos observados sobre 15.220 casos confirmados de EEB se puso de manifiesto, por orden descendente, la presencia de nerviosismo, coceo, dificultad de movimiento, pérdida de peso, disminución de la producción de leche, comportamiento anómalo, nerviosismo al franquear los umbrales, cambio de temperamento, caídas, recelo, agresividad, dificultad de erguimiento, temblor, hiperestesia y posición yacente. Por orden descendente, la frecuencia de los signos clínicos sobre un total de 17.154 casos confirmados de EEB incluyó primero a los cambios del comportamiento (recelo o miedo, cambio de temperamento, comportamiento anómalo, posición anormal de las orejas, nerviosismo al franquear los umbrales, rechinar de dientes y agitación) seguido de los cambios que afectaban a la sensibilidad (con hiperestesia, coces, lameteo excesivo, respingo de cabeza, presión o restregamiento de la cabeza contra objetos y ceguera.) y, finalmente, los que afectan al movimiento y postura (ataxia, temblor, posición anormal de la cabeza, caídas, posición yacente, golpeo de los menudillos, paresia y vueltas sobre si mismo) (Rodríguez Ferrié *et al.*, 2001)

LESIONES

Desde el punto de vista anatomopatológico, las características generales de las lesiones de la EEB son similares a las que se observan en la tembladera ovina y en otras EE, con una modificación esponjiforme de determinadas regiones del encéfalo, que se evidencia sin demasiadas dificultades al microscopio óptico, mientras que al microscopio electrónico se detecta la presencia de FAS (fibrillas asociadas al scrapie) en muestras sometidas a tratamientos con detergentes, las cuales contienen PrP^{Sc}.

BIBLIOGRAFÍA

Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E.J., Watt, C.J., Udy, H.J., Mawhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R.E., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austrin, A.R. & G.A.H. Wells. 1996. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle *Nature*, 382:779-788

Barlow, R.M. & D.J. Diddleton. 1990. Dietary transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Vet. Rec.*, 126:403-406.

Bradley, R. 1990. Bovine spongiform encephalopathy clinocopathology, epidemiology and resarch. EU actions and control. *In Actualités 90 en Buiatrie*. Paris. Eds. J. Espinasse & M. Savey. Polygone. Toulouse, 2840

Bradley, R. 1994. Embryo transfer and its potential role in control of scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Liv. Prod. Sci*, 38:51-59.

Bradley, R. 1999. BSE transmission studies with particular referente to blood. *Dev. Biol. Stand.* 99:35-40

Bradley, R. & J.W. Wilesmith. 1994. Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br. Med. Bull.*, 49:932-959.

Curnov, R.N., Hodge, A. & J.W. Wilesmith. 1997. Analysis of the bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study: the discordant casecontrol pairs. *Applied Statistics*, 46:299-304.

Donnelly, C.A., Ghani, A.C., Ferguson, N.M., Wilesmith, J.W. & R.M. Anderson. 1997. Analysis of the bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study: evidence for direct maternal transmission. *Applied Statistics*, 1997, 46:321-344

Donnelly, C.A., Gore, S.M., Curnow, R.N. & J.W. Wilesmith. 1997. The bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study: its purpose and findings. *Applied Statistics*, 46:299-304

Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Ghani, A.C., Wilesmith, J.W. & R.M. Anderson. 1997. Analysis of dam-alf pairs of BSE cases: confirmation of a maternal risk enhancement. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 264:1647-1656.

Fisher, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P. & A. Aguzzi. 2000. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 408(6811):479-483

Foster, J.D., Bruce, M., McConnell, I., Chree, A. & H. Fraser. 1996. Detection of BSE infectivity in brain and spleen of experimentally infected sheep. *Vet. Rec.*, 138:546-548.

Foster, J.D., Hope, J. & H. Fraser. 1993. Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.*, 133:339-341

Gore, S.M., Gilks, W.R. & J.W. Wilesmith. 1997. Bovine spongiform encephalopathy maternal cohort study. Exploratory analysis. *Applied Statistics*. 46:303-320

Heim, D., Detwiler, L., Williams, E. & U. Kihm. 2001. Situación actual de la encefalopatía espongiforme bovina, el prurigo lumbar y la enfermedad debilitante crónica. OIE. 69 SG/12/CS3 C

Hoinville, L.J., Wilesmith, J.W., & M.S. Richards. 1995. An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the 'feed ban'. *Vet. Rec.*, 136:312-318

Kimberlin, R.H. 1994. A scientific evaluation of research into bovine spongiform encephalopathy (BSE). In: *Transmissible Spongiform Encephalopathies*. Procc. Consult. BSE. EU., Eds Bradley & Marchant Brussels 455-477.

Kimberlin, R. & J. Wilesmith. 1994. Bovine Spongiform Encephalopathy Epidemiology, Low Dose Exposure and Risks. *Ann. N.Y.Acad.Sci.*, 724:210-220.

Lozano Barriuso, J.J. Informe de las actuaciones realizadas hasta el 31 de mayo de 2001 por la Consejería de Agricultura y Ganadería (Junta de Castilla y León) en el marco del Programa Coordinado de Control y Vigilancia de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles. Valladolid, 1 de junio de 2001.

MAFF-Bovine Spongiform Encephalopathy in Great Britain: a progress report, 1997

Matthews, D. 1990. Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). The Story So Far, *State Vet. J.*, 44:3-18

Middleton, D. & R.M. Barlow. 1993. Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extra-neural tissues of affected cattle. *Vet. Rec.*, 132:545-547

OIE. Código Zoonosario Internacional. Capítulo 3.2.13. y documentación de apoyo (enero. 1998). Paris

OIE. Estadísticas. <http://www.oie.int>

Pearson, G.R., Wyatt, J.M. Henderson, J.P. & T.J. Gruffyd Jones. 1993. Feline spongiform encephalopathies: a review. *Vet. Ann.* 33:1-10

Lord Phillips of Worth Matravers, J. Bridgeman & M. Ferguson-Smith. 2000. The BSE Inquiry . The Report. <http://www.bseinquiry.gov.uk>

Rodríguez Ferri, E.F., Moreno García, B., Alvarez Martínez, M. & J.F. García Marín. 2001. Lo que Ud. debe saber de los priones y el mal de las vacas locas Caja España. León.

SEAC-Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (SEAC) statement on dorsal root ganglia. Department of Health. London. 1997.

Wells, G.A.H., Dawson, M., Hawkins, S.A.C., Green, R.B., Dexter, I., Francis, M.E., Simmons, M.M., Austin, A.R. & M.W. Horigan. 1994. Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 135:40-41

Wells, G.A.H., Dawson, M., Hawkins, S.A.C., Austin, A.R., Green, R.B., Dexter, I., Horigan, M.W. & M. Simmons. 1996. Preliminary observations on the pathogenesis of BSE. *In: Bovine Spongiform Encephalopathy. Procc. 6th Int. Workshop on SE. Virginia. C.J. Gibbs. Jr. Edit., Springer Verlag, N.Y., 2844.*

Wells, G.A.H. Hawkins, S.A.C., Green, R.B., Austin, A.R., Dexter, I., Spencer, Y.I., Chaplin, M.J., Stack, M.J. & M. Dawson. 1998. Preliminary observation on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update (letter). *Vet. Rec.* 142:103-106

Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.B., Jeffrey, M., Dawson, M. & R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 121:419-420

Wells, G.A.H. & J.W. Wilesmith. 1995. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.*, 5:91-103

Wells, G.A.H., Wilesmith, J.W. & I.S. McGill. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol.*, 1:69-78

Wilesmith, J. 1991. The epidemiology of Bovine Spongiform Encephalopathy. *Seminars in Virology*, 2: 239-245

Wilesmith, J. & M. Atkinson. 1991. Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiological studies of the origin. *Vet. Rec.*, 128: 199-203

Wilesmith, J., Ryan, J.B.M. & M.J. Atkinson. 1991. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.*, 128:199-203

Wilesmith, J.W., Wells, G.A.H., Cranwell, M.P. & J.B.M. Ryan. 1988. Bovine Spongiform Encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.*, 123:638-644

DIAGNÓSTICO DE LA EEB

ANTECEDENTES CLÍNICOS Y EPIDEMIOLÓGICOS

Los síntomas coincidentes con los que definen la presencia de EEB constituyen en la actualidad el único método posible de diagnóstico en el animal vivo y solo 'de sospecha'. Conviene recordar, a este respecto, que (OIE):

- La EEB es una enfermedad subaguda o crónica, con un periodo de incubación de 4-5 años, que afecta a animales adultos de forma esporádica y que cursa con síntomas nerviosos, incluyendo:

- Alteraciones del comportamiento: Respuesta anómala a estímulos y órdenes, aprensión, miedo, depresión, sobresaltos y, en ocasiones, conducta agresiva.

- Hiperexcitabilidad (hiperestesia) y/o hiperreflexia, temblores (tremor), prurito (posible parestesia).

- Incoordinación evidente de movimientos (ataxia), movimientos anormales (fibrilación, temblores y mioclonias) y caídas frecuentes. Ataxia locomotora con hipermetría.

- Problemas neurovegetativos, con disminución de la rumia, bradicardia y alteración del ritmo cardíaco.

- En ocasiones, prurito

- Pérdida de peso y alteración del estado general

- En los bovinos de los zoológicos el cuadro es similar, aunque a veces la diferencia se establece por la aparición súbita y curso más corto. En los gatos los primeros signos suelen afectar al comportamiento y el signo evolutivo más sistemático es la ataxia.

- Que existe un elevado número de enfermedades nerviosas en el ganado bovino que comparten síntomas similares en algún momento del curso clínico.

- Que siempre resulta necesario realizar un buen examen clínico y un diagnóstico diferencial. En la tabla se mencionan algunas de las enfermedades de mayor interés que se deberían considerar en el diagnóstico diferencial (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

Tabla 12. Diagnóstico diferencial. Enfermedades más frecuentes con sintomatología nerviosa, que podrían confundirse con la EEB.

	Cetosis nerviosa (trastorno metabólico)	Listeriosis (<i>Listeria monocytogenes</i>)	Enfermedad de Aujeszky o pseudorrabia (Herpesvirus)
Similitudes	Puede ser de curso subagudo o crónico Alteración del comportamiento: muerden y lamen objetos y su propio cuerpo, prurito nervioso, hiperexcitabilidad (hiperestesia) y, a veces, comportamiento agresivo.	Incoordinación de movimientos (ataxia). En algunas ocasiones (escasas) la enfermedad se prolonga más de 15 días.	Comportamiento agresivo. Prurito Temblores continuos (tremor)
Diferencias	Ausencia de incoordinación de movimientos	Curso agudo o subagudo. Tendencia a moverse en círculos. Parálisis faciales unilaterales. Hipersalivación (ptialismo)	Curso agudo o sobreagudo. Ausencia de incoordinación de movimientos. El prurito es muy intenso, con automutilaciones. Hipersalivación (ptialismo)

Otros procesos con los que debe diferenciarse incluyen hipomagnesemia, polioencefalomalacia o necrosis corticocerebral, tumores intracraneales y otras encefalitis de origen bacteriano o vírico.

DIAGNOSTICO HISTOLÓGICO

Considerando las poco resolutivas características clínicas y la ausencia de lesiones macroscópicas en la necropsia, se comprende que el diagnóstico de la EEB se haya basado hasta hace bien poco, casi exclusivamente en técnicas histológicas.

En la mayoría de los casos, la presencia de una encefalopatía espongiiforme en cortes microscópicos del tejido nervioso central, ha resuelto el problema. Se ha investigado tradicionalmente la aparición de cambios vacuolares en secciones del tejido nervioso

central, en las neuronas de varias regiones del cerebro, incluyendo espongiosis, gliosis y astrocitosis (Hadlow, 1959).

La experiencia del estudio de un gran número de casos de EEB confirma que los cambios vacuolares están presentes de modo casi invariable en el 99'6% de los casos confirmados, en particular a nivel del obex (médula oblongada y en el puente), así como también en el tronco del encéfalo (núcleo del tracto solitario, tracto espinal del nervio trigémino, núcleo vestibular y formación reticular) por lo que cuando se observan, se consideran patognomónicos (Badiola *et al.*, 1997). Se trata de lesiones bilaterales y simétricas, con vacuolización del pericarion y del neuropilo. Según la OIE, la correlación entre el diagnóstico clínico y el diagnóstico neurohistológico puede llegar a superar, en técnicos con una experiencia adecuada, el 90%

Para la obtención de las muestras se prefiere la extracción del encéfalo entero en los casos en que la incidencia es baja o cuando los animales sospechosos proceden de países donde la EEB ha hecho su aparición recientemente, pues no conviene permitirse fallos por esta causa. La OIE recomienda, también, la extracción del tronco cerebral y la médula espinal. En cualquier caso, la extracción debe hacerse cuanto antes después de la muerte o sacrificio del animal (OIE. Manual de Normas, 1996).

Ultraestructuralmente pueden ponerse de manifiesto las FAS (fibrillas asociadas al *scrapie*) (Cooley *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999), aunque este método está en desuso porque, entre otras cosas, no aparecen siempre y, además, se consideran en realidad artefactos debidos a la manipulación o procesado de las muestras que producen la polimerización espontánea de la PrP^{Sc} 27-30 en presencia de detergentes (Prusiner, 1998).

DIAGNÓSTICO DE BASE INMUNOLÓGICA

Se ha señalado, en otro lugar, que el fragmento conservado, entre los aminoácidos 110 y 128 del PrP, posee gran interés. Así es, en realidad, pues utilizando fragmentos del mismo, por ejemplo desde el 105 al 120, se han conseguido producir distintos tipos de anticuerpos monoclonales y policlonales (producidos en conejo) de utilidad diagnóstica (Kascsak *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1999), como es el caso de los F89/160.1.5. (O'Rourke *et al.*, 1998), 6H4 (Baron *et al.*, 1999 y 1999; Mangé *et al.*, 2000), 15B3 (Korth *et*

al., 1997) u otros (Bodemer, 1999; Bonn, 2000; Harmeyer *et al.*, 1998; Korth *et al.*, 1999; Krasemann *et al.*, 1996; Zanusso *et al.*, 1998).

Por lo general se han seleccionado distintos tipos de técnicas inmunohistoquímicas (Van Keulen *et al.*, 1995; 1996) y otras no histológicas, fundamentalmente ELISA e inmunoblotting (*western blotting*) (Cooley *et al.*, 1998; Hardt *et al.*, 2000; Manousis *et al.*, 1998). En cualquier caso, el procedimiento de trabajo se basa en aprovechar la diferencia de sensibilidad, entre la PrP^{Sc} y la PrP^{Sc}, a las proteasas. Un tratamiento de la muestra con proteinasa K hace que solamente si existe PrP^{Sc} permanezca y, por tanto, pueda llevarse a cabo su unión con los anticuerpos, que es puesta de manifiesto, de distinto modo, según la técnica utilizada. Uno de los problemas destacados por la WHO/OMS, es la necesidad de estandarizar procedimientos y normalizar reactivos, con urgencia (Asheret *al.*, 1999).

En las técnicas inmunohistoquímicas se detecta el prión infeccioso en las secciones del tejido nervioso central mediante el empleo de anticuerpos antiPrP marcados con alguno de los muchos colorantes que se utilizan en la práctica. El resultado permite detectar la presencia de los priones infecciosos, fundamentalmente en el interior de las neuronas (aunque no exclusivamente). El estudio se lleva a cabo mediante un microscopio óptico adecuado.

El empleo simultáneo de ambas técnicas (histología e inmunohistoquímica) es el método más sensible y fiable en el diagnóstico de la EEB. Según se ha señalado por distintos laboratorios internacionales de referencia, comparativamente con el resto de los métodos de diagnóstico, la inmunohistoquímica es la técnica de mayor sensibilidad y especificidad, siendo la de referencia en el diagnóstico definitivo de la enfermedad. Asimismo, en estas técnicas no existe el peligro de falsos positivos por problemas de contaminación de la muestra o como consecuencia de manipulaciones erróneas de la misma. En contrapartida, exige de personal muy especializado para su valoración (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

Buscando acortar el tiempo de ejecución de estos métodos referidos, la UE intentó desde el principio estimular la iniciativa de los científicos para lograr métodos sensibles de menor tiempo de ejecución. En 1998, la Dirección General XXIV (hoy Dirección General de Sanidad y Protección de los Consumidores) de la UE convocó un concurso para seleccionar pruebas diagnósticas rápidas. Inicialmente se presentaron 10 propuestas, de las que fueron seleccionadas cuatro (Anonimus, 1999), y de estas, una de ellas fue descartada poco

tiempo después. Las otras tres demostraron los niveles deseables de sensibilidad y especificidad, así como otras características favorables¹. Finalmente, en el caso de nuestro país (y también en otros de nuestro entorno) la propuesta suiza, a cargo de la firma *Prionics*, fue la seleccionada final. Con ella, se han ejecutado en España más de 100.000 diagnósticos hasta la fecha y en otros países cifras superiores, además de diversos estudios de campo (Madec *et al.*, 2000; Schaller *et al.*, 1999). En la actualidad se está validando un método ELISA para su próxima introducción como alternativa diagnóstica.

¹ La sensibilidad de estos métodos rápidos ha sido valorada en animales con presencia de clínica y lesiones (histopatología: método de referencia en este caso). De igual modo y, pese a la supuesta especificidad del 100% de los mismos, los positivos y dudosos deben ser siempre confirmados mediante inmunohistoquímica, para evitar errores de laboratorio o de contaminación de muestras.

Tabla 13. Métodos para el Diagnóstico *Rápido* de la EEB

METODO	TIPO	Sensibilidad	Especificidad
E.G.&G.Walla. Ltd. U.K.	Procedimiento inmunométrico, no competitivo, que utiliza dos Ac monoclonales diferentes. Utiliza la tecnología DELFIA para generar la señal de lectura. El análisis combina una fase de preparación de la muestra con un inmunoensayo para la detección de PrP. Se prepara un extracto a partir de una muestra de 100 mg de tronco cerebral con un agente caotrópico. Se digiere con dos concentraciones de proteinasa K y se concentra por centrifugación. Se resuspende en 6M guanidina, se diluye al 1:5 ^o y se analiza por DELFIA. El resultado está listo en 24 horas	70%	90%
Prionics A.G., Suiza	Immunoblotting basado en un western blotting para la detección de un fragmento de PrP ^{Sc} resistente a las proteasas (PrP 2730). Utiliza el Ac monoclonal 6H4. Se homogeneiza un trozo de tronco cerebral o médula espinal cervical. Se digiere con proteinasa K y se hierve en un buffer SDS. Luego se carga en el gel de poliacrilamida SDS. Después de la electroforesis las proteínas se transfieren a una membrana de nylon y el PrP 2730 se detecta utilizando el monoclonal por quimoluminiscencia. El tiempo de prueba es de 7-8 horas	100%	100%
Enfer Tech. Ltd. Irlanda	ELISA quimoluminiscente que puede completarse en menos de 4 horas. Utiliza un Ac policlonal anti-PrP ^{Sc} para la detección. Utiliza un Ac secundario antiespecie conjugado con peroxidasa.	100%	100%
Commissariat à L'énergie Atomique (CEA), Fr	Inmunoensayo tipo <i>sandwich</i> para PrPres que se lleva a cabo después de la desnaturalización y concentración de la muestra. Utiliza dos Ac monoclonal. Los resultados se obtienen en menos de 24 horas, aunque puede reducirse al automatizarse	100%	100%

La pretendida 'rapidez' tiene que ver con un tiempo 'teórico' de ejecución de entre 4 y 15 horas (dependiendo del sistema elegido), frente a los 2 o 4 días que es preciso invertir en la histología-inmunohistoquímica. Otra ventaja de estas pruebas es que permiten realizar un número elevado de muestras por día, especialmente algunos sistemas que mejor que otros se prestan a su automatización.

En cualquier caso, el problema sigue siendo el de disponer de un método que permita el diagnóstico en el animal vivo. A este respecto, se ha descrito en *escrapie*, la posibilidad de diagnóstico a partir de biopsias de tonsilas, de modo similar al método utilizado en las

enfermedades humanas, o a partir del tercer párpado Recientemente se ha descrito, también, que el plasminógeno sanguíneo, tanto del hombre como del ratón, si se utiliza para recubrir pequeñas barritas magnéticas, sirve para detectar PrP^{Sc}, discriminando de PrP^C, a la que no se une (Fisher *et al.*, 2000). Otras informaciones sobre intentos o proyectos de métodos para el diagnóstico in vivo no son accesibles en la bibliografía internacional, por el momento.

BIBLIOGRAFÍA

Anonimus. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission. DirectorateGeneral XXIV. Consumer Policy and Consumer Health Protection. 8 July 1999

Asher, D.M., Padilla, A.M. & M. Pocchiari. 1999. WHO consultation on diagnostic procedures for transmissible spongiform encephalopathies: need for reference reagents and reference panels. Geneva. Switzerland, 2223. March. 1999. *Biologicals*. 27:3, 265-272

Badiola, J.J., Monleon, E., Varera, R. & A. Vargas. La encefalopatía espongiforme bovina (BSE) y su implicación en la sanidad animal y en la salud pública *Vet. Madrid*. 38-43

Baron, T.G.M., Betemps, D., Groschup, M.H. & J.Y.Madec. 1999. Immunological characterization of the sheep prion protein in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Medical Microbiol.*, 25, 379-384

Baron, T.G.M., Madec, J.Y. & D.Calavas. 1999. Similar signature of the prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathylinked diseases. *J. Clin. Microbiol.*, 37:11, 3701-3704

Bodemer, W. 1999. The use of monoclonal antibodies in human prion disease. *Naturwissenschaften*. 86:5, 212-220

Bonn, D. 2000. Future uncertain for reliable vCJD screening tests. *Lancet* 356:9225, 228

Cooley, W.A., Clark, J.K. & M.J. Stack. 1998. Comparison of scrapie-associated fibril detection and western immunoblotting for the diagnosis of natural ovine scrapie *J. Comp. Pathol.*, 118:1, 41-49

Dieter, R.S., 2000. Prion protein in tonsil and appendix tissue *Lancet*. 356:9228, 505

Fisher, M.B., *et al.*, 2000. Binding of disease associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 408, 479-483

Hadlow, W.J. 1995. Neuropathology and the scrapie-kuru connection. *Brain Pathol.*, 5:1, 27-31

Hardt, M., Baron, T. & M.H. Groschup. 2000. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J. Comp. Pathol.*, 122:1, 45-53

Harmeyer, S., Pfaff, E. & M.H. Groschup. 1998. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J. Gen. Virol.*, 79:937-945

Hill, A.F., Butterworth, R.J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M.N., Thomas, D.J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J.E., Spencer, M., King, A., Asarraj, S., Iroside, J.W., Lantos, P.L. & J. Collinge. 1999. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*. 353:9148, 183-189

Kascsak, R.J., Fersko, R., Pulgiano, D., Rubenstein, R. & R.I. Carp. Immunodiagnosis of prion disease. *Immunol. Invest.*, 26:1-2, 259-268

Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K. & B. Oesch. 1997. Prion (Pr^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*. 390:6655, 74-77

Korth, C., Streit, P. & B. Oesch. 1999. Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein. *Methods Enzymol.*, 309, 106-122

Krasemann, S., Groschup, M.H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. & Bodemer, W. 1996. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in Pr⁰ mice. *Mol. Med.*, 2:6, 725-734

Madec, J.Y., Belli, P., Calavas, D. & T. Baron. 2000. Efficiency of western blotting for the specific immunodetection of proteinase K resistant prion protein in BSE diagnosis in France. *Vet. Rec.*, 146:3, 74-76

Manousis, T., Sachamanoglou, M., Toumazos, P., Verghese-Nikolakaki, S., Papadopoulos, O. & T. Sklaviadis. Western blot detection of Pr^{Sc} in Cyprus sheep with natural scrapie. *Vet. J.*, 159:3, 270-273

Korth, C., Stierli, V.B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wulrich, K. & B. Oesch. 1997. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390:74-77

OIE. Manual de normas. 1996. Paris

OIE. Código Zoosanitario Internacional. Paris. 2000

OIE. Situación sanitaria EEB. Últimas noticias.(www.oie.int)

O'Rourke, K.I., Baszler, T.V., Miller, J.M., Spraker, T.R., Sadler, Riggleman, I. & D.P. Knowles. 1998. Monoclonal antibody F89/160.1.5 defines a conserved epitope on the ruminant prion protein. *J. Clin. Microbiol.*, 36:6, 1750-1755

Prusiner, S.B. 1998. Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:13363-13383

Rodríguez Ferri, E.F. 2001. Priones. Un nuevo tipo de agente transmisible. *Prod. Anim.*, 162:3-40

Rodríguez Ferri, E.F., Moreno García, B., Álvarez Martínez, M. & J.F. García Marín. 2001. Lo que Ud. debe saber de los priones y el mal de las vacas locas. Caja España. León.

Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biuffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandevelde, M., Heim, D., Oesch, B. & M. Moser. 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)*. 98:5, 347-443

Schreuder B.E., Geertsma, R.E., Van Keulen, L.J., Van Asten, J.A., Enthoven, P., Oberthur, R.C., de Koeijer, A.A. & A.D. Osterhaus. 1998. Studies on the efficacy of hyperbaric rendering procedures in inactivating bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents. *Vet. Rec.*, 142(18):474-480

Takahashi, H., Takahashi, R.H., Hasegawa, H., Horiuchi, M., Shinagawa, M., Yokoyama, T., Kimura, K., Haritani, M., Kurata, T. & K. Nagashima. 1999. Characterization of antibodies raised against bovine PrP-peptides. *J. Neurovirol.* 5:3, 300-307

Van Keulen, L.J., Schreuder, B.E.C., Meeuw, R.H., Poelen-Van den Berg, M., Mooij Harkes, G., Vromans, M.E.W. & J.P.M. Langeveld. 1995. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet. Pathol.*, 32:299-308

Van Keulen, L.J., Schreuder, B.E.C, Melen, R.H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M.E.W. & J.P.M.Langeveld. 1996. Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J. Clin. Microbiol.*, 34:5, 1228-1231

SEGURIDAD ALIMENTARIA EN LA EEB

Desde que se realizaron los primeros diagnósticos sobre la EEB en el Reino Unido, los mensajes de tranquilidad a la población acerca de la inexistencia de riesgos para la salud humana, apoyados en la opinión de distintos comités creados al efecto, como el Comité Southwood, el Comité Tyrrel, el Comité de Agricultura de la Cámara de los Comunes o el de Expertos Independientes (*Spongiform Encephalopathy Advisory Comité*, SEAC), no representaban nada más que una apariencia (los responsables británicos eran de la opinión que, sí la enfermedad fuera transmisible, las estadísticas de ECJ en el Reino Unido deberían de haberse incrementado muy perceptiblemente, al menos en relación con las equivalentes de otros países). De este modo, aunque al principio los criterios de actuación fueron solamente de sanidad animal, minimizando el riesgo humano o estableciendo como 'muy remota' la posibilidad de su transmisión al hombre, ya en 1988, por un lado se declaró la aplicación de la 'Zoonosis Order' (Informe Phillips, 2000) y por otro, en 1990 se constituyó la Unidad de Vigilancia de la ECJ cuyo objetivo era identificar cualquier cambio en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob que pudiera ser atribuible a la transmisión de la EEB a la población humana.

Por recomendación de distintos comités de expertos como el Comité Southwood, en 1988 se prohibió el uso de las harinas de carne y huesos procedentes de rumiantes en la alimentación del ganado vacuno, como suplementos concentrados, medida a la que ya nos hemos referido y que 4-5 años después, en 1992-93 se tradujo en el comienzo del descenso en la curva que registraba el número de casos de EEB. A partir de 1993 y 1994, se publicaron datos del seguimiento de la enfermedad en el marco de una Acción Concertada de la UE, en la que participó España (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

En 1996, el 20 de marzo, Mr. Dorrell, Secretario de Estado británico para la Salud fue interpelado por la oposición en el Parlamento y, probablemente, condicionado por el Comité de Expertos Independientes, tuvo que admitir la existencia de datos epidemiológicos sobre

diez casos 'atípicos' de ECJ (cuatro en hombres y seis en mujeres), cuya explicación 'más probable' pudiera estar relacionada con la EEB, a través del consumo de carne u otros productos procedentes de los animales enfermos. Will *et al.*, (1996) describieron los casos en un artículo publicado en *The Lancet* a comienzos de abril. La noticia produjo una alarma social tremenda y en poco tiempo adquirió dimensiones alarmantes, alimentada por un desconocimiento científico y epidemiológico que dio pábulo a numerosas interpretaciones, en las que el carácter sensacionalista de muchos medios de comunicación británicos jugaron un papel muy destacado.

La preocupación comenzó con dos casos en jóvenes de edad inferior a los 20 años de los que se tuvo noticia en 1995. Además de lo sorprendente de la edad, en los cortes histológicos del tejido nervioso, ambos casos presentaban 'placas floridas', como las que se observan en el kuru, muy frecuentes también en la EEB y cuya presencia es prácticamente residual en los casos de ECJ (menos del 5% de los casos). A estos dos primeros casos se unieron otros ocho, con los que se describió un patrón clínico y anatomopatológico peculiar, común a todos. La relación con la EEB se fundamentó en la coincidencia en los cambios de comportamiento (más ataxia que demencia), presencia de 'placas floridas' y en la discrepancia con algunos de los patrones considerados típicos de la ECJ, incluyendo el electroencefalograma, la edad de los pacientes, el curso de la enfermedad y otros, pero sin ninguna duda, la coincidencia también en el tiempo, de una enfermedad en el ganado bovino británico muy abundante y mal conocida, tanto en su origen como en las características epidemiológicas y patogénicas. En cualquier caso, ni entonces, ni ahora, se dispone de datos que demuestren directamente la transmisión, pues ello necesitaría de la disponibilidad de 'voluntarios' humanos a los que se inoculase material procedente de bovinos con diagnóstico de la enfermedad y en los que pudiese demostrarse la presencia de la enfermedad.

En cualquier caso, existían (y aún existen) muchas preguntas sin contestar, incluyendo la razón de la edad de los primeros casos (una media de 29 años con extremos hasta los 19 y aún 15 años) o la ausencia de factores de riesgo conocidos comunes a ellos, ni de naturaleza laboral, ni relacionados con la dieta, ni de ningún otro tipo. Otra cuestión sorprendente, admitida la relación entre la enfermedad humana y la bovina planteaba, a la vez, la razón que excluía de la enfermedad a otras especies animales como cerdos, aves o peces, que también habían consumido los piensos concentrados a los que se había implicado ya, en el caso de los bovinos, como causa de aparición y difusión del proceso. En

estos años la hipótesis de la transmisión alimentaria se ha consolidado y el número de casos a fecha de 30 de marzo de 2001, asciende a 97 incluyendo los casos confirmados y los probables y 9 probables que murieron de la enfermedad pero donde la confirmación no fue posible (gov.uk/cjd/stats/april01.htm). En nuestro país, hasta la fecha, no se ha descrito ningún caso.

Infectividad:

Debe recordarse aquí, brevemente, algunas de las consideraciones realizadas en otros puntos, por su repercusión práctica final desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, aunque con carácter general debe entenderse que muchos de los conocimientos de los que se dispone, aún hoy, no son suficientemente precisos. Ello, sin duda ha condicionado (y lo sigue haciendo) puntos de vista o rectificaciones en algunas actuaciones de prevención y control, siempre obsesionadas con un principio de prudente precaución que todo lo justifica.

1. El conocimiento de estas enfermedades no es bueno, todavía. La hipótesis de su origen protéico (priones), siendo la más verosímil, pero no es aceptada, aún, por la totalidad de los científicos (se calcula que más del 90% la consideran la mejor explicación, pero todavía surgen esporádicamente otras).

2. La infecciosidad de la mayoría de las EETs es muy alta, especialmente en algunos tejidos, que son capaces de transmitirlos a dosis bajas (se calculan hasta 10^8 a 10^9 UI/mg de tejido). En el *scrapie* (que se considera similar a la EEB desde este punto de vista) se ha calculado que la DI (o DL) por vía intracerebral es de 10^7 DL₅₀/g de tejido. Por vía oral, sin embargo, la dosis necesaria para producir los mismos efectos ha de aumentarse 10^5 veces. En el caso de la EEB, un gramo de tejido cerebral administrado por vía intracerebral en el ratón, parece que contiene entre 10^7 y 10^{10} DL₅₀.

3. En el *scrapie* ovino el contagio suele ser oral. En el ileon (placas de peyer), las PrP^{Sc} se replican sobre PrP^C y se dirigen al bazo en el que la réplica continúa sobre las células dendríticas, igual que en los ganglios. A través de los nervios que componen la red del sistema simpático y parasimpático, los priones acceden a la médula espinal y por ella al encéfalo. También pueden llegar al SNC a través de la sangre, parece que transportados por los linfocitos B. En cualquier caso, el modelo ovino no parece extrapolable a otras especies, al menos en su totalidad. En el ganado bovino, ni el bazo ni el tejido linfoide parece que presentan infectividad detectable; además la infecciosidad del ileon parece que es más precoz en las ovejas.

4. La aparición de síntomas exige la acumulación de gran cantidad de priones infecciosos a nivel del SNC, especialmente a nivel del encéfalo. Este hecho, junto con una dosis suficiente, justifica los largos periodos de incubación.

5. Para explicar la espongiosis y pérdida de neuronas se han propuesto distintas explicaciones, incluyendo el efecto neurotóxico de una región de la PrP^{Sc} (aa 106-26) por incremento del estrés oxidativo al faltar la PrP^C (quien tendría un efecto antioxidante). También, fallos en el control de la apoptosis, por la misma causa.

6. Los resultados de la determinación de infecciosidad de los tejidos animales en la EEB en experimentos con terneros y ratones (que ya han sido expuestos) han sido discutidos por algunos en razón de la barrera de especie (el ratón es 10³ veces menos sensible a la EEB que los terneros) aunque debe considerarse, también, que las dosis y las vías utilizadas compensan ampliamente este inconveniente (la vía intracerebral, hasta 10⁵ veces más sensible que la vía oral).

Así las cosas no es tarea fácil indicar con precisión qué órganos y tejidos contienen el agente de la EEB y, sobre todo, cuáles en razón de su título o cantidad, plantean riesgo de infección para el hombre (o los animales) a través de su consumo. A la inversa, cuáles carecen de infecciosidad y, por tanto, su consumo no implica riesgo.

Hemos de referirnos nuevamente a los resultados expuestos en otro lugar y a los que hemos hecho alusión antes. Recordemos que no se pudo demostrar infectividad alguna, mediante inoculación en ratones en ninguno de los siguientes materiales y tejidos de las terneras infectadas experimentalmente: Piel, gasa, sangre (células blancas sanguíneas, coágulo sanguíneo, suero fetal bovino, suero), líquido cerebroespinal, tracto gastrointestinal (esófago, rúmen, retículo, omaso, abomaso, intestino delgado proximal, colon distal y proximal y recto), corazón, riñón, hígado, tráquea, pulmón, bazo, páncreas, tonsilas, ganglios linfáticos (mesentéricos, pefemorales y retrofaríngeos), músculos (diafragmático, semitendinoso, masetero y longísimo), nervios (cola de caballo, ciático proximal, esplénico y tibial), aparato reproductor de la hembra (ovario, cotiledones placentarios, carúncula uterina, líquidos amniótico y alantódeo, mama y leche) ni del aparato reproductor del macho (epidídimo, próstata, semen, vesícula seminales y testículo).

En el primer grado de peligrosidad están los tejidos del SNC donde se replica y acumula la PrP^{Sc} de forma principal: encéfalo (sesos) y médula espinal, incluyendo los

ganglios espinales nerviosos. El Comité Científico Director de la UE ha señalado que el encéfalo, la médula espinal, los ganglios espinales y los ganglios del trigémino representan los principales riesgos para el consumo humano directo. 'Podrían constituir el 96% del potencial infeccioso procedente de un animal infectado, si entran en la cadena alimentaria en los nueve meses que preceden a la manifestación clínica de la enfermedad'.

Materiales Especificados de Riesgo (MER)

Un hecho que no admite duda es que los riesgos de contagio, tanto del hombre como de los animales, pueden evitarse reduciendo la exposición al agente infeccioso. A tal efecto, las consideraciones realizadas antes acerca de la infectividad de los distintos órganos o tejidos, constituye un punto crucial. De igual modo debe atenderse, también, al conocimiento de las posibles vías de infección, con el propósito de evitar el contagio.

Las restricciones tendentes a evitar cualquier riesgo de exposición (en cualquier caso evitar su entrada en la cadena alimentaria) del ser humano o los animales, o a reducirlo al mínimo posible, han de aplicarse de forma preferente a los tejidos o materias protéicas derivadas de ellos, procedentes del ganado bovino. Estos materiales han recibido el nombre de 'Materiales Especificados de Riesgo' o, abreviadamente, MER.

Puede afirmarse que, desde el comienzo de la epidemia en el Reino Unido, el posible riesgo humano había sido ya considerado por el Comité Southwood (DoH & MAFF, 1989) estableciendo actuaciones concretas dentro de un amplio conjunto de medidas de lucha. La primera medida con este propósito fue adoptada en el Reino Unido en agosto de 1988 cuando se estableció el sacrificio de todos los animales sospechosos de padecer EEB y su eliminación de la cadena alimentaria.

Aunque al comienzo de las intervenciones los cadáveres de los animales eran, o bien incinerados o bien enterrados, pronto se adoptó la medida de utilizar exclusivamente éste último procedimiento. En noviembre de 1989 se introdujo la prohibición del uso, para el consumo humano, de los MER procedentes de animales de más de 6 meses. Se consideró absolutamente improbable la posibilidad de detección de infectividad en cualquier parte o tejido de un animal de edad inferior a los 6 meses que se encontrara en periodo de incubación de la EEB (Hadlow *et al.*, 1979, 1982).

Los MER fueron definidos como resultado de los estudios de distribución y título de infección en los tejidos y órganos de ovejas afectadas de forma natural por *scrapie* (Hadlow *et al.*, 1982). En los años siguientes y, con el fin de obtener información específica, procedente ya de bovinos afectados de EEB, fueron investigados en el bioensayo murino un amplio rango de tejidos procedentes de casos naturales de EEB, confirmados, con el fin de determinar la presencia de infectividad (SEAC, 1997, Wells *et al.*, 1994, 1996 y 1998) y sobre esta base no hubo que hacer ninguna rectificación a las prohibiciones establecidas antes. Más adelante se llevó a cabo el estudio, que ya ha sido referido, sobre la patogénesis después de la administración oral de homogenizados de cerebro, con el fin de determinar la distribución de la infectividad en los tejidos y órganos durante el periodo de incubación (Wells *et al.*, 1994, 1996 y 1998). Como se recordará, el primer tejido en el que se detectó infectividad, solamente 6 meses postexposición, fue el ileon distal y por esa razón (aunque había que considerar el tamaño de la dosis utilizada para la infección, 100 g de un homogenizado de cerebro) la medida adoptada sobre los MER en noviembre de 1989 se amplió para incluir los intestinos y timo de todos los bovinos, excepto en los de animales de edad inferior a 2 meses. El timo fue incluido como una medida de control empírico y no como resultado de los estudios de patogénesis. A partir de los 32 meses postexposición los tejidos del SNC, incluyendo el encéfalo y la médula espinal, ya contenían infectividad, igual que las raíces de los ganglios espinales dorsales (componentes del SNP), hallazgo que juntamente con la evidencia de infectividad en animales con síntomas clínicos o al final del periodo de incubación, dio lugar a otra medida de control, introducida en diciembre de 1997 en el Reino Unido, consistente en la prohibición de la venta de cualquier tipo de carne con hueso (Bruce *et al.*, 1997).

La aparición de los diez primeros casos de la vECJ y su posible relación con la EEB en 1996 dieron lugar a que el SEAC recomendara que las canales de los bovinos de más de 30 meses de edad fueran deshuesadas en instalaciones convenientemente autorizadas, aunque la decisión final fue la de impedir que entraran en la cadena alimentaria humana o animal, los bovinos de más de 30 meses. En ésta época también se adoptaron otras medidas, entre las que destaca la inclusión de la cabeza completa de los bovinos de más de 6 meses de edad como MER.

La normativa en vigor actualmente (la Decisión 2001/2/CE, que modifica la 2000/418/CE), señala como MER, en el ganado bovino, el cráneo (incluyendo sesos y ojos) y la médula espinal. Por lo que respecta a la cabeza, se pueden aprovechar la lengua y los

músculos masticatorios. Respecto de la columna vertebral (espinazo), la dificultad que se plantea para la extracción completa de la médula espinal, además de la complicación que supone la presencia de neuronas en los ganglios de la raíz dorsal, han justificado su inclusión reciente dentro de los MER, quedando excluido el rabo que carece de médula espinal. En el segundo grado de peligrosidad, se incluyen las amígdalas, el bazo y el intestino.

El ganado ovino y caprino han sido desde hace años (y lo siguen siendo) motivo importante de preocupación pues, aunque hasta la fecha no se ha demostrado ningún caso de EEB natural en las ovejas o en las cabras, la transmisión experimental ha sido posible en unas y otras, tanto por vía oral como por otros procedimientos. Por esta razón, por la relación del agente de la EEB con el del *scrapie* ovino, por la diferente distribución ya señalada del prión infeccioso del *scrapie* y por la práctica imposibilidad de poder distinguir clínicamente entre prurito lumbar ovino y EEB en estas últimas, la posible presencia de EEB en las ovejas representaría un riesgo adicional de introducción de material infectado en la cadena alimentaria humana (OIE, 2001). En estas condiciones, la normativa sobre MER incluye también los correspondientes materiales del ganado ovino y caprino, que posee idénticas consideraciones, con la particularidad de incluir, también, el bazo.

En cualquier caso, un aspecto importante se refiere a la edad de los animales, pues tratándose de enfermedades que presentan periodos de incubación muy largos, parece que solo al final del mismo, antes de la aparición de signos clínicos (lo que en la práctica supone hablar de animales de una cierta edad) se ha producido el acumulo de suficiente cantidad de material infeccioso para que puedan resultar peligrosos para el consumidor. Se estima que una edad de 12 meses supone suficiente protección para los consumidores, por lo que los MER deben ser retirados en los animales que la superen citada edad. El animal más joven con síntomas de EEB descrito, hasta la fecha, tenía 20. Se exceptúa de esta consideración el intestino, que como ya se ha comentado, además de constituir el auténtico punto de entrada, también supone el primer asentamiento con réplica de los priones infecciosos y en la práctica, el punto donde con mayor precocidad se describe actividad infectiva.

Así pues, el resumen de MER considerados en la actualidad incluye:

1. El cráneo, incluidos el encéfalo y los ojos, las amígdalas, la columna vertebral y la médula espinal de los bovinos de más de 12 meses de edad, así como los intestinos, desde el duodeno hasta el recto, de los bovinos de todas las edades.

2. El cráneo, incluidos el encéfalo y los ojos, las amígdalas, la columna vertebral y la médula espinal de los ovinos y caprinos de más de 12 meses de edad o en cuya encía haya hecho erupción un incisivo definitivo, así como el bazo de los ovinos y caprinos de todas las edades.

Una vez extraídos, los MER han de teñirse con un colorante, depositarse en recipientes especiales y destruirse por incineración en una planta autorizada o por inhumación en un vertedero autorizado, previo un tratamiento mínimo a 133°C y 3 bares de presión de vapor durante 20 minutos.

En España, el R.D. 1911/2000 establece que son los mataderos y las salas de despiece quienes deben efectuar la tinción de los MER, llevar un registro en el que se recojan las cantidades producidas, fecha de salida y destino, depositarlos en recipientes estancos para uso exclusivo, con cierre e identificación, y habilitar un local para almacenarlos. Se crea también la figura de los almacenes intermedios de MER, como centros de recogida y almacenamiento temporal.

Puede afirmarse que los MER y la carne extraída mecánicamente, sobre todo si procede de columnas vertebrales que mantienen las raíces de los ganglios dorsales o residuos de médula espinal, representan el factor de riesgo más importante para la salud de los consumidores. La prohibición sistemática de los primeros y de la extracción mecánica de la carne, evitando su entrada en la cadena alimentaria, constituye con seguridad la medida más importante en la protección de los consumidores. Para comprobar el cumplimiento de la prohibición en los productos cárnicos, se ha puesto a punto un método de análisis que permite detectar la presencia de tejido nervioso (encéfalo y médula espinal) en los productos cárnicos de venta al público (Lücker *et al.*, 2000).

El Comité Científico Director de la UE (1997) sobre la base de los resultados, ya comentados (Hadlow *et al.*, 1980, 1982; SEAC, 1997; Wells *et al.*, 1994, 1998 y 1998) a partir de bioensayos de infectividad en ratones y otras informaciones que refieren la previsible infectividad para el hombre en la ECJ de la duramadre y glándula pituitaria y en la

posible contaminación de los tejidos de los bovinos en el momento del sacrificio, estableció una gradación en cuatro categorías (I a IV) según la infecciosidad relativa de los diferentes órganos y tejidos:

Categoría I (infectividad elevada):

- Vacuno: sesos, ojos, médula espinal y ganglios espinales, duramadre, glándula pituitaria, cráneo y columna vertebral, pulmones.
- Ovejas y cabras: sesos, ojos y médula espinal, ganglios espinales y columna vertebral; bazo y pulmones.

Categoría II (infectividad media):

- La totalidad del intestino, desde el duodeno al recto, amígdalas.
- Bazo de vacuno, placenta, útero, tejidos fetales, glándula suprarrenal, líquido cefalorraquídeo, ganglios linfáticos.

Categoría III:

- Alguna infectividad: nervio ciático, pituitaria, adrenales, colon distal.
- Infectividad mínima: hígado, páncreas, timo², médula ósea, otros huesos³, mucosa nasal, nervios periféricos.

Categoría IV (no se ha detectado infectividad):

- Músculos esqueléticos, corazón, riñones, calostro, leche, grasa eliminable de los depósitos, glándulas salivales, saliva, tiroides, ubres, ovarios, testículos, vesículas seminales, tejidos cartilagosos, tejido conjuntivo, piel, pelo, coágulos de sangre, suero, orina, bilis, heces.

Vigilancia. Trazabilidad: La trazabilidad o rastreabilidad supone el seguimiento o monitorización de un producto desde que es producido y obtenido hasta su consumo. Representa un sistema preventivo nuevo en Sanidad Animal y Salud Pública, que permite la

² Se ha extirpado este órgano de bovinos a los que se había administrado material infeccioso de EEB por vía oral y se ha inoculado intracranealmente en bovinos receptores. En todos los casos se demostró la falta de infectividad (Comisión Europea, 12 de enero de 2001).

³ La esperable presencia de médula ósea en los huesos largos significa que estos huesos, teniendo en cuenta su infectividad potencial en los animales de mayor edad, deben colocarse en la misma categoría que la médula ósea

vigilancia y control en todas las fases, desde la producción animal hasta la venta al público de la carne (*'de la granja a la mesa'*).

Surge como una práctica que responde al derecho de los consumidores por conocer el historial de la carne que compran: desde el origen de los animales, dónde y cómo se han criado, cómo se han alimentado y dónde fueron sacrificados, su edad en el momento del sacrificio, etc.,. La trazabilidad o seguimiento del alimento exige un gran esfuerzo que implica la necesidad de un sistema obligatorio de etiquetado de la carne de vacuno que aumentará la eficacia de las actividades de control oficial y ofrecerá, por ello, más garantías a los consumidores. Esta filosofía de control integral *'desde la granja a la mesa'* se está comenzando a aplicar a muchos otros productos de origen animal destinados al consumo humano.

Las actuaciones relacionadas con la inspección y el control oficial de la carne y otros productos alimenticios son, en el momento actual más intensas y eficaces que lo han sido en tiempos pasados. No debe desdeñarse que, a menudo, muchos de los nuevos problemas que se descubren, son el resultado inmediato de esta mayor eficacia de las actividades de control y, sin duda, constituirán un nuevo estímulo para perfeccionarlas. Cabe esperar, por tanto, que de modo paulatino, el consumidor recobre la confianza perdida, en la seguridad de que tras esta crisis, por alarmante y dolorosa que resulte, la carne y, en general los alimentos, ofrecerán aún mayores garantías sanitarias (Rodríguez Feri *et al.*, 2001).

Respecto de la consideración que merecen los productos cárnicos y su posible infectividad, dependerá de su composición (tejidos y, en su caso, órganos que les integren). En el caso de los embutidos, además, también la envoltura, si se trata de tripa natural. En España, no se fabrican embutidos que contengan tejido nervioso y son raros los embutidos en cuya constitución intervienen las vísceras, y más aún, las de vacuno y pequeños rumiantes; A este respecto, el bazo de ovejas y cabras es la víscera más peligrosa, mientras que los pulmones solo suponen peligro en la medida en que puedan contaminarse como consecuencia del método de aturdimiento (con pistolas de bala cautiva penetrante), por laceración y destrucción de tejido cerebral, que podría pasar a la circulación sanguínea y el hígado posee escasa infectividad por lo que no debe plantear riesgos. En cuanto a las tripas para embutidos, está claro que no pueden utilizarse si proceden de vacuno, ya que están consideradas como MER. La carne recuperada mecánicamente puede constituir, también,

un material de riesgo, por la posibilidad de que contenga ganglios espinales (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

Aunque hasta la fecha, no se ha detectado infectividad ni en la leche (Taylor *et al.*, 1995) y, consiguientemente, tampoco en los productos lácteos, se produjo alguna desconfianza mediática tiempo atrás. Sin embargo, todos los estudios realizados hasta la fecha han concluido en la falta de infecciosidad de este producto. En un experimento (Comisión Europea, 17 de mayo de 1999) se inoculó intracranealmente en ratones susceptibles, leche recogida de vacas que padecían EEB (confirmadas) y ninguno de los animales manifestó signos de enfermedad. En la actualidad están en curso experimentos desarrollado por las autoridades británicas, que utilizan ratones transgénicos para el gen PrP humano, con el fin de descartar toda sospecha.

En la actualidad aún se discute la posible infectividad de la sangre, aspecto éste de gran interés práctico y enormes repercusiones. En este sentido, resulta difícil sustraerse a la tentación de no relacionar la infectividad demostrada en algunos tejidos linfoides, como la de las tonsilas de las víctimas humanas de la enfermedad (ECJv) o la situación del ratón, en el que también parece que el tejido linfoides está implicado en el pase de la infectividad del intestino al cerebro, con lo que no sería desdeñable decidir que entra dentro de lo posible que el prión infeccioso pueda encontrarse en algún momento en la sangre de los bovinos.

Houston *et al.*, (2000) comprobaron que la transfusión sanguínea (400 ml de sangre) desde una oveja que había sido infectada con cerebro procedente de un caso de EEB a los 318 días post-infección y sin que la oveja manifestara aún ningún tipo de signo, otra oveja sana, evolucionó a EEB experimental en este segundo animal al cabo de 629 días, lo que no solo demostró la posibilidad de que las ovejas se infecten de EEB por vía oral (ya comentado antes) sino que la sangre puede ser infecciosa dentro de la misma especie animal. Hay que hacer notar, no obstante, que los datos corresponden a un único animal y que, hasta la fecha, no se ha denunciado ningún caso de ECJ iatrogénica a través de la sangre, con la particularidad de que se cita el caso de un paciente que falleció (por causa diferente) 23 años después de haber recibido una transfusión de sangre procedente de un donante que padeció ECJ (Heye *et al.*, 1994; Brown, 2000). Por si fuera poco, también se exhibe como prueba de lo contrario, el que nunca se ha observado un aumento de la prevalencia de ECJ entre la población hemofílica, como es sabido grupo de riesgo sometido a frecuentes transfusiones de sangre (Gomez Lucia *et al.*, 2001).

Como quiera que sea, es evidente que el riesgo existe, por mucho que faltan evidencias aún. A este respecto, considerando que el suero fetal bovino es un ingrediente principal utilizado para el crecimiento de las células en cultivo, sistemas habituales en la producción de antígenos especialmente de origen vírico con fines vacunales e, igualmente, que su destino llega a muchas enfermedades y especies animales, incluido el hombre, la posibilidad de transmisión iatrogénica, inter o intraespecífica de los priones infecciosos de la EEB, estaría abierta, mediante la utilización de vacunas en cuya elaboración se hayan utilizado estas materias. Debe recordarse que la prensa internacional se hizo eco, en octubre de 2000, de la retirada en el Reino Unido de una vacuna contra la polio ante la sospecha de que estuviera contaminada y pudieran transmitir la ECJ (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001). En el mismo sentido recordemos que como medida de seguridad, algunos países (Suiza, EE.UU., Canadá, Australia y Francia) han prohibido las donaciones de sangre de personas que hayan vivido durante más de un año en Gran Bretaña entre 1980 y 1996. Recientemente se ha descrito que el plasminógeno sanguíneo se une selectivamente al prión PrP^{Sc} (Fisher *et al.*, 2000). De confirmarse este extremo podría desarrollarse una prueba diagnóstica para determinar si la sangre de donantes, antes de su utilización en las transfusiones, contiene priones y, según se señala, poder establecer algún tipo de depuración biológica.

En relación con los posibles riesgos ligados a cosméticos y productos médicos elaborados con tejidos bovinos, es sabido que tanto la gelatina como el sebo (grasa de rumiantes) entran en la composición de algunos productos alimenticios, cosméticos y medicamentos. En 1996, la OMS había considerado a una y otro inocuos, y en 1998, el Comité Científico Director de la UE, confirmó ese carácter, matizando que las materias primas debían proceder, siempre, de animales declarados aptos para el consumo, excluyendo los MER de las cadenas de producción en los países no libres de EEB, y que los procesos tecnológicos de fabricación debían ser los apropiados.

Harinas: Las harinas de carne y de huesos fueron el origen de la EEB en el Reino Unido y, seguramente lo han sido también en los países donde se han diagnosticado casos de la enfermedad. Hasta ahora, su prohibición ha ido seguida del descenso progresivo del número de casos, a partir de 4-5 años. La lectura negativa es que a la vez se ha originado un problema de dimensiones colosales pues a los stocks de estos residuos, que crecen sin cesar, no se les ha encontrado hasta la fecha un destino que sea visto con complacencia

por todos los sectores. Por un lado los MER han de ser inactivados con garantía para la destrucción de los priones infecciosos, tarea nada fácil, como hemos visto y, por otro lado, el procedimiento de eliminación ha de ser respetuoso con el medio ambiente evitando contaminaciones indeseables de pasto o el agua, cuando no de liberación de productos a la atmósfera que sean perjudiciales para el hombre y los animales. La incineración en cementeras y centrales térmicas o el almacenamiento en los centros de tratamiento de residuos son, hasta ahora, las salidas planteadas.

Riesgos laborales: La EEB no se considera una enfermedad profesional. El nivel de riesgo asociado es el que corresponde a un agente biológico del grupo 3; no obstante, ante la posibilidad de transmisión al hombre a través de la conjuntiva ocular, mucosas nasal y bucal, y las heridas y erosiones cutáneas, los ganaderos, los veterinarios y el personal de matadero y de las industrias cárnicas han de tomar las debidas precauciones en los casos sospechosos o simplemente si desean protegerse frente a la posibilidad de contraer la enfermedad. Nada se ha indicado, sin embargo, sobre la protección del personal. En cualquier caso, se consideran recomendables las siguientes prácticas de trabajo (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001):

- No quitar la médula espinal a mano, para evitar cortes, pinchazos o erosiones. Se han desarrollado máquinas que realizan la operación sin riesgos.
- No extraer el encéfalo (sesos) de las cabezas, ni del vacuno ni del ovino. Sólo la lengua y la carne de carrillada.
- Para la toma de muestras para análisis utilizar los procedimientos recomendados, no traumáticos (cucharillas). En caso necesario es preferible la apertura manual que con sierra mecánica.
- Para el esquinado o división en medias canales, llevar máscaras para cubrir la cara y guantes. Evitar salpicaduras mediante el uso de sierras con protección.
- Desinfección y esterilización frecuente del utillaje, preferentemente a base de hipoclorito sódico o una combinación de sosa y calor.
- No parece que tenga importancia la transmisión por inhalación, ni el contacto con animales vivos en explotaciones animales.

El trabajo en los laboratorios de diagnóstico e investigación supone un riesgo de exposición evidente, pese a que el grado de infectividad observado en las operaciones de trabajo habituales, en su parte más comprometida (formación de aerosoles y exposición de mucosas) es, aparentemente, pequeño. No debe olvidarse, sin embargo, que en un caso y en otro se pueden manejar preparados en los que la concentración de la actividad infecciosa (priones infecciosos, PrP^{Sc}) son sustancialmente superiores a la que puede encontrarse en condiciones naturales.

La normativa legal recomienda en los trabajos de laboratorio, como mínimo, un nivel 2 de contención, incluyendo toda la analítica necesaria. Ello supone, el acceso restringido al lugar de trabajo, la utilización de desinfección, control de vectores, superficies de trabajo de fácil limpieza e impermeables al agua, sistemas de almacenamiento de seguridad, la manipulación del material de trabajo en sistemas que le separen físicamente del medio ambiente (cabinas de seguridad biológica), indumentaria de protección (calzas, cubrepelos, mascarillas, gafas, batas desechables, guantes de látex y de protección frente a cortes, etc.), instalaciones de descontaminación y lavado e inactivación de efluentes. Parece conveniente, en cualquier caso, que las dependencias donde se llevan a cabo este tipo de trabajo, no incluyan otro tipo de actividad.

hasta la fecha no se ha documentado ningún caso de vECJ adquirido en el trabajo o en el laboratorio. La experiencia de casos de exposición accidental al agente de la ECJ esporádica pone de manifiesto que la inoculación directa es el procedimiento principal a tener en cuenta. En cualquier caso, el uso de cabinas de seguridad biológica es muy tranquilizador. La manipulación y preparación de homogenizados de tejidos de riesgo o infectados o la centrifugación prolongada para la concentración de priones, deben llevarse a cabo en condiciones adecuadas.

Cuantas referencias se han hecho a la inactivación del material sólido o líquido por procedimientos físicos (autoclave) o químicos (preferentemente hipoclorito sódico o sosa) mixtos, son también aquí de aplicación en todos sus extremos.

En caso de accidentes, por ejemplo cortes o pinchazos, se recomienda dejar sangrar profusamente y lavar la herida con una solución de hipoclorito sódico al 5% o sosa 2N, repitiendo el lavado varias veces. En caso de un derramamiento o salpicaduras, especialmente si se asocia con la producción de aerosoles, se recomienda evacuar el área

de trabajo, al menos durante 30 minutos, antes de retornar al trabajo. Si no existen aerosoles asociados o después de que el riesgo haya remitido, se recomienda fregar hasta 3 veces con una solución de sosa 1N y después lavar cuidadosamente con agua (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

CONTROL

Se puede señalar que, desde el principio, el esfuerzo de los gobiernos ha ido dirigido a evitar la difusión de la enfermedad entre los bovinos y otras especies animales y proteger a la población humana.

De particular relevancia debe considerarse la prohibición en el Reino Unido, en 1988, de las harinas de rumiantes para la alimentación del ganado bovino, pues el descenso de casos después de un periodo de tiempo equivalente al periodo de incubación demostró con claridad la importancia de estos vehículos en la transmisión de la EEB. De extrema gravedad debe considerarse, por tanto, que se permitiera continuar su exportación y que, consecuentemente, otros países de la UE (entre ellos España), consintieran su importación.

Aparte de este hecho, de importancia extraordinaria, la medida más destacada entre 1994 y 1996, desde el punto de vista del control de la enfermedad, quizás sea la prohibición en 1994, por parte de la UE, de las harinas de carne y de huesos procedentes de mamíferos en la alimentación de los rumiantes (Decisión 94/381/CE), prohibición que probablemente no se cumplió en nuestro país. En un reciente informe presentado por el Ministerio de Agricultura (Anon, 2001) se señala que desde 1998 en que se dispone de muestras fiables de análisis para la detección de harinas de carne y hueso en los piensos para rumiantes, la evolución fue muy negativa. En ese año se detectaron un 1'5% de muestras positivas que se interpretaron en su mayoría como resultado de contaminaciones cruzadas. El dato fue del 1'9% en el caso de 1999 y de un 2'7% en el año 2000 situación que hace descartar totalmente, la teoría de la contaminación cruzada y supone, en opinión del Ministerio, la entrada directa e intencionada de concentrados en los piensos. El informe señala que los dos sectores en los que se ha producido el fraude mayor, incluyen las vacas de producción lechera (en las que las harinas producen mayores rendimientos lecheros), los piensos de arranque post-destete en el caso de los terneros (lo que supone el peor momento epidemiológico para el contagio del animal, aunque como la mayoría de ~~los~~ animales se

destinan al sacrificio a edad temprana, no suponen un riesgo real) y el ganado de lidia, al que se suministran en el último año de vida para conseguir un acabado 'a gusto del aficionado taurino actual'. En estos últimos, el riesgo sanitario es mínimo o despreciable, aunque sí existe en los reproductores.

Debe señalarse también como medida importante en la lucha contra la EEB el sacrificio y la destrucción de los animales afectados o que podían estarlo, iniciada en el Reino Unido en 1988 y en los demás países europeos cuando comenzaron a detectarse casos. En estos últimos, el sacrificio y la destrucción se llevó a cabo, por lo general, en las explotaciones enteras, aunque se hubiera diagnosticado un sólo caso, medida muy contestada por parte de los ganaderos y solo justificable por la seguridad de evitar que nuevos animales entrasen en la cadena alimentaria, en particular como consecuencia de falta de pruebas de diagnóstico *in vivo* fiables.

A partir de 1996, coincidiendo con la descripción de casos humanos sospechosos y el embargo comercial del Reino Unido, se tomaron diversas medidas para evitar la introducción de la EEB en España y el posible riesgo de su transmisión al hombre. En este contexto, la Decisión 96/239/UE prohibió la exportación de ganado vivo procedente del Reino Unido, igual que la carne y los productos cárnicos de origen bovino, de la harina de carne y de huesos procedentes de mamíferos y de productos destinados a una utilización médica, cosmética y farmacéutica.

También cabe resaltar la Decisión 96/449/U, que se hizo extensiva a todos los países de la UE, que obligó a someter a un estricto tratamiento térmico inactivante a los animales muertos y los decomisos y desperdicios de matadero destinados a la producción de harinas para la alimentación animal (no rumiantes): al menos 133°C, 3 bares de presión y 20 minutos. Esta Decisión fue sustituida y ampliada por la 97/534/UE, más completa y detallada, con el mismo fin.

En 1996 se cerró el comercio de algunos tejidos como sesos, médula espinal, ojos, timo (mollejas), amígdalas, bazo e intestinos, de bovinos procedente de Irlanda, Francia, Portugal y Suiza, donde se habían detectado algunos casos de EEB. En el caso de ganado vivo se decomisaban y destruían los citados tejidos. A partir de octubre se extendió la prohibición, en las mismas condiciones, a ovinos y caprinos y los mismos tejidos.

La Decisión 97/534/UE, que entró en vigor en enero de 1998, prohibió la entrada de los MER en la cadena alimentaria, obligando a su destrucción. En todos los países de la UE, y por tanto también en España, los MER no podían entrar ni en la cadena alimentaria humana ni en la animal. En España no se llegó a aplicar por distintas razones (no existía EEB, se plantearon grandes dificultades para la extracción de la médula y debido al coste que suponía su ejecución) prorrogándose una vez tras otra. En cualquier caso, sí que se decomisaba, teñía y destruían los MER procedentes de animales importados del Reino Unido y otros países con casos de EEB.

El Comité Científico Director de la Comisión Europea clasificó los países y definió los MER según el riesgo de presencia de las EETs y teniendo en cuenta, también, las medidas cautelares adoptadas. Los grupos considerados fueron 'altamente improbable', 'improbable pero no excluida', 'probable pero no confirmada' o 'confirmada a un bajo nivel' (en el que se incluye España) y 'confirmada a un elevado nivel'. La OIE había incluido a España en el grupo de países 'libres o provisionalmente libres'.

Como consecuencia de la importante disminución del número de casos de EEB en el Reino Unido la UE autorizó a partir de agosto de 1999, el levantamiento del embargo de la exportación para el caso de los animales nacidos después de agosto de 1996. En el caso de la carne debía estar deshuesada, sin nervios y ganglios visibles, de animales mayores de 6 meses y menores de 30 y corresponder a animales hijos de vacas que en los 6 meses siguientes al parto no presentaron síntomas de la enfermedad. Se exigía, además, una trazabilidad rigurosa. Solo Francia mostró oposición.

Como consecuencia del incremento del número de casos en Francia a partir de 1998, España prohibió la entrada de bovinos de más de 20 meses de edad (también de Irlanda). Italia y Austria adoptaron decisiones similares, incluyendo también a la carne. Una vez que se declararon en España los primeros casos de EEB y por imposición comunitaria, la prohibición tuvo que levantarse.

Recomendaciones de la OIE: La Oficina Internacional de Epizootias (OIE) ha tomado parte activa en la lucha y control contra la EEB, desde el principio. Su comité internacional, que fue informado oficialmente en 1988 sobre la enfermedad, propició la primer reunión de expertos en 1990 en la que ya se adoptaron las primeras recomendaciones para prevenir su transmisión, por medio del comercio y otras medidas de igual interés. En la reunión de 1992,

la OIE incluyó recomendaciones sobre la EEB en el Código Zoosanitario Internacional. La versión actual del código (2000) recomienda la notificación obligatoria y la imposición del análisis de los tejidos cerebrales de casos sospechosos como requisito previo para permitir el intercambio comercial de ganado y productos de origen bovino. Señala también la necesidad del sacrificio y eliminación por incineración de los animales enfermos (diagnosticados positivos) y la prohibición de administrar a los rumiantes piensos concentrados que contenga harinas de carne y hueso.

La OIE establece la realización de una evaluación de riesgos como requisito previo para determinar la situación concreta de un país, respecto de la EEB, así como la incorporación de un sistema eficaz de vigilancia sobre la enfermedad.

Respecto de la evaluación de riesgos señala el interés, en cada caso, de averiguar si en un país en particular, se importó en el pasado o en el presente, material potencialmente infectado y de ser así, valorar las circunstancias que permitían o permiten hacer lo necesario para impedir que la enfermedad se propague. Basándose en estos criterios, el Comité Científico Director de la UE ha efectuado evaluaciones de riesgo en varios países, incluido España a la que se situó en el nivel o grupo 3 de riesgo (ver antes), aunque la evaluación se llevó a cabo antes de la descripción de los primeros casos de la enfermedad, que corresponde a países sin casos o con pocos, pero sometido a un riesgo importante (conjuntamente con otros 9 países europeos entre los que se encuentran Francia, Bélgica, Alemania, Italia, Holanda, Suiza y otros).

Entre la evaluación de riesgos que se deben considerar se incluyen los que se refieren a la introducción del agente de la EEB en un país, que debe valorarse no solo en referencia a las estadísticas de importaciones sino cotejando éstas con las exportaciones del Reino Unido y de los demás países de riesgo. Hay que tener en cuenta que la prohibición que impuso la UE sobre las exportaciones del UK solo se referían a animales vivos y no se aplicaba a las harinas. En 1994 se prohibió en toda la UE alimentar a los rumiantes con harinas de carne y hueso. Como resultado de ello se exportaron a otros países, incluidos los no europeos por un valor que en 1993 llegó a alcanzar cifras de casi 30.000 Tm (25.000 fueron exportadas a los países europeos en 1989).

También deben valorarse los riesgos de propagación de la EEB en un país, averiguando el destino de los productos importados (harinas y animales vivos) pues de este

modo se podrá tener una idea de la capacidad de los sistemas del país para prevenir la introducción del agente de la EEB en la cadena alimentaria y reducir su propagación. Un punto central consiste en saber lo que ocurre con los MER después del sacrificio de los animales pues su interés es muy alto dado que algunos materiales como el encéfalo o la médula concentran (o pueden hacerlo) gran cantidad de priones infecciosos. Si estos materiales se extraen del matadero y se incineran, se reduce de forma sustancial el riesgo de reciclar el agente patógeno, pero si se utilizan para fabricar piensos, el riesgo de amplificación del agente de la EEB es muy elevado

Otro punto central de la evaluación de riesgos tiene que ver con el destino de los residuos animales y de los cadáveres, dado las características extremas de resistencia a la inactivación de estos agentes. Sobre las cifras aportadas en su lugar hay que señalar que algunos experimentos recientes han puesto de manifiesto que, aunque se apliquen temperaturas muy elevadas, puede quedar infectividad residual, especialmente si la carga infecciosa inicial es elevada (Brown *et al.*, 2000) pero si en general se respetan las recomendaciones mínimas establecidas por la UE (Taylor y Woodgate, 1997) el riesgo disminuye de forma muy importante.

Otro punto importante es el seguimiento de la prohibición de alimentar a los rumiantes con harinas de carne y huesos y no solo por la implicación directa, sino por lo que se ha dado en llamar contaminación y alimentación cruzadas (Heimet *et al.*, 2001) propiciadas en las fabricas de harinas al mantener simultáneamente distintas líneas de fabricación, incluyendo por ejemplo harinas para porcino y aves.

En lo que se refiere a la vigilancia, un sistema adecuado puede facilitar las claves necesarias para la comprensión de la situación real de la enfermedad en un determinado territorio. La declaración obligatoria de la enfermedad representa, por ello, un requisito básico, que incluye no solo los casos clínicos sospechosos compatibles con la EEB (vigilancia pasiva), sino también un sistema de vigilancia activa, consistente en la realización de pruebas diagnósticas en los animales que no han sido notificados como sospechosos, pero que pertenecen a poblaciones de riesgo. Para llevar a cabo estas actuaciones se han puesto a punto, en los últimos años, una serie de pruebas rápidas, validadas por la UE que han permitido 'sacar a la luz' numerosos casos que hubieran pasado desapercibidos y, consecuentemente, hubieran podido entrar en la cadena alimentaria. El problema actual es que, todavía, este tipo de determinaciones carecen de la suficiente sensibilidad para permitir

la detección de animales infectados pero que se encuentran en un momento del periodo de incubación en el que la concentración de priones infecciosos en el encéfalo es insuficiente. Sin embargo, con los recursos de que se dispone en la actualidad, si que puede acercarse a la incidencia de la enfermedad y tener una buena aproximación de la situación (Heimet *et al.*, 2001)

EL CONTROL DE LA EEB EN ESPAÑA. CASTILLA Y LEÓN

La EEB es una enfermedad de declaración obligatoria, que figura en la lista B de la OIE. Por recomendación de la UE, para llevar a cabo un sistema de vigilancia, se puso en práctica un 'Programa Nacional de Vigilancia y Control de las EE de los rumiantes' que se inició en 1997, dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, y las CC.AA. El sistema incluía el estudio mediante métodos histológicos e inmunohistoquímicos, de un número aproximado de 700 muestras (fijado por la UE) anuales de encéfalos procedentes de bovinos, ovinos y caprinos, tomadas al azar, incluyendo los de animales que presentara síntomas nerviosos. Como parte del Plan, se designó un Laboratorio Nacional de Referencia par las EE en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y varios Laboratorios de Apoyo entre los que se incluyeron los correspondientes en las Facultades de Veterinaria de Barcelona (Universidad Autónoma) y León (Universidad de León) y el Laboratorio Vasco de Derio.

Mediante convenio suscrito entre la Universidad de León y la Junta de Castilla y León, en los 4 años de referencia (1997-2000) se estudiaron en el Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria un total de 2.322 muestras, de las que 601 correspondieron a bovinos adultos y el resto a ovinos y caprinos. En el caso de las muestras procedentes de bovinos, solo 24 correspondieron a vacas con síntomas nerviosos y la mayoría fueron tomadas en matadero de forma aleatoria. De todas las muestras estudiadas, ninguna fue positiva (Rodríguez Ferri *et al.*, 2001).

El Real Decreto 3454/2000 de 22 de diciembre (BOE del 23 de diciembre), publicó el 'Programa integral coordinado de Vigilancia y Control de las EETs de los animales' que diferencia un total de 4 Programas de Actuación que se integran en Programa Nacional. Respectivamente incluye el Programa de Vigilancia de las EETs, el Programa de Control de las sustancias empleadas en la alimentación de los animales, el Programa de Inspección de los establecimientos de transformación de subproductos y animales muertos y, finalmente el Programa de control de los materiales de riesgo especificados (MER).

El Programa de Vigilancia tiene por objeto la detección de la EEB y la tembladera ovina, así como la adopción de medidas para su erradicación. La sospecha se refiere a los animales de más de 20 meses con síntomas neurológicos y de comportamiento y que no responden al tratamiento o que son diagnosticados en el laboratorio. En el caso de la EEB, la primera fase de la vigilancia activa, que entró en vigor a partir del 1 de enero de 2001, incluye la investigación de la enfermedad en todos los bovinos de más de 30 meses objeto de 'sacrificio especial de urgencia' y en los de más de 20 meses que procedan de países con un número importante de casos (Irlanda, Francia, Portugal o Suiza), o en los de la misma edad muertos en las explotaciones o durante el transporte. La segunda fase comenzará el 1 de julio del 2001 y se desarrollará sobre ovinos y caprinos de más de 12 meses con síntomas sospechosos y resistentes al tratamiento, o los de la misma edad moribundos, sin síntomas de enfermedad o que presenten otras patologías progresivas.

La realización del diagnóstico en los animales de 20 meses persigue la localización de explotaciones infectadas y el control de la EEB en las explotaciones y en la población bovina general, mientras que la realización de las pruebas diagnósticas en los animales de 30 meses tiene, como principal objetivo, proteger al consumidor. Se obliga a los propietarios a la comunicación de la sospecha, y se procede al sacrificio, toma de muestras y remisión a un laboratorio autorizado, para su diagnóstico. Si se confirma, se sacrifican todos los animales de la explotación o el rebaño, con destrucción de los mismos mediante incineración, igual que los alimentos (piensos y harinas) que se mantengan en la explotación, seguido de la limpieza y desinfección de las instalaciones. Se establece un programa continuado de formación y divulgación para informar a todos los sectores, dirigido a veterinarios, ganaderos, universidades e institutos de investigación, etc.

A este respecto la Decisión 2000/373/CE establece, para los países miembros de la UE, dos tipos de pruebas de laboratorio para llevar a cabo el diagnóstico de los casos de EEB. Las primeras (que se utilizan en casos sospechosos, cualquiera que sea su origen) consisten en un exámen histopatológico, con recurso en los casos dudosos o negativos a otras pruebas basadas en la inmunocitoquímica, inmunoblotting (*western blot*) o demostración de las fibrillas características mediante microscopía electrónica. Las segundas, que se utilizan en el contexto del Programa y va dirigidas a detectar los priones infecciosos en el tejido nervioso, se corresponden con los métodos rápidos que ya fueron comentados, incluyendo 3 opciones (2 pruebas ELISA y un *western blot*) en cualquier caso

tras el tratamiento de las muestras con pruebas u otro tipo de preparación previa. Los casos positivos mediante las pruebas rápidas, tienen que ser confirmados en el Laboratorio de Referencia mediante inmunohistoquímica.

El Programa de Control de las sustancias empleadas en la alimentación de los animales prohíbe el uso de proteínas animales. La fabricación de piensos para animales de producción tiene que realizarse en industrias específicas. Se establecen diversos tipos de controles: documental, de identidad, físico y del proceso de fabricación. Ante un control con resultado positivo se prohibirá la fabricación, comercialización y distribución de cualquier pienso animal.

El Programa de Inspección de establecimientos de transformación de subproductos animales y animales muertos tiene por objeto comprobar que se cumplen con rigor los tratamientos de garantía que se han establecido, que aseguran la inactivación de estos agentes.

Finalmente, el Programa de Control de los MER establece la obligación de su destrucción en condiciones adecuadas para la inactivación de cualquier tipo de infectividad potencial en los mismos y evitar su entrada en la cadena alimentaria.

Agencia de Seguridad Alimentaria: La sensibilidad de los consumidores europeos, que han atravesado en poco tiempo por experiencias desastrosas en relación con los alimentos, ha condicionado algunas iniciativas que pretenden la mayor neutralidad (independencia de la industria alimentaria o de los sectores productores) para facilitar la toma de decisiones. En enero de 2000 vio la luz el 'Libro Blanco de Seguridad Alimentaria' que planteó modernizar la legislación y 'elaborar un conjunto de normas coherente y transparente, reforzando al mismo tiempo los controles desde la granja al consumidor y aumentando la capacidad del sistema de asesoramiento científico'. El Libro Blanco es, sin duda, la base doctrinal de todas las actuaciones que se comprometen, más adelante.

Como consecuencia de la respuesta de los Estados Miembros sobre esta y otras iniciativas, la Comisión Europea adoptó a comienzos de noviembre de 2000 una propuesta de Reglamento del Parlamento y del Consejo, que sienta las bases de la legislación alimentaria y crea una Autoridad Alimentaria Europea (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria) (AAE) y puede entenderse que es, en la práctica, un movimiento defensivo para

prevenir las nuevas fuentes de riesgos sanitarios que se plantean en la producción de alimentos (Anon., 2000). Con la AEE, la Unión Europea no hace otra cosa que seguir las indicaciones de las agencias internacionales (FAO yOMS) que han introducido ya, desde hace años, los principios de seguridad y determinación y gestión del riesgo. La propuesta es la pieza central de la estrategia de la Comisión para la política Alimentaria Europea y lo previsto es cinco objetivos básicosy principales (Información Europea IP/00/1270):

- Emitir dictámenes científicos independientes (a petición de la Comisión, de los Estados Miembros, de los organismos alimentarios nacionales o del Parlamento Europeo) y de calidad óptima. Esta es, sin duda principal tarea. De la mano, se establecerá una red con los organismos similares de sus Estados Miembros.
- Proporcionar asesoramiento sobre cuestiones alimentarias de carácter técnico para apoyar la acción política y legislativa en las áreas de la nutrición, la seguridad alimentaria, la salud y el bienestar de los animales y la salud de las plantas,
- Recopilar y analizar datos sobre dietas, exposición, riesgos, etc., con el objetivo de supervisar la seguridad de los alimentos en la UE,
- Identificar los riesgos emergentes
- Gestión cotidiana del sistema de alerta rápida para alimentos y piensos
- Labor de comunicación para informar a los ciudadanos sobre todos los asuntos de su competencia .

La Autoridad Alimentaria Europea desempeñará un papel crucial en la determinación de riesgos relacionados con todas las actividades, dentro del sector de los alimentos y los piensos. Está previsto su entrada en funcionamiento alrededor del 2003.

En España, existe ya un proyecto de Ley para crear una agencia de este tipo. Como consecuencia del Debate del Estado de la Nación de julio de 1999 (BO de las Cortes Generales, núm. 715), el Congreso de los Diputados aprobó una Propuesta de Resolución en la que se instaba al Gobierno a la creación de una Agencia Española para la Seguridad Alimentaria. El texto completo de la propuesta, reza lo que sigue:

El Congreso de los Diputados insta al Gobierno para que, con respeto de las competencias asumidas por las CC. AA. y con base en las actuales estructuras del Ministerio de Sanidad y Consumo, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y demás

instituciones relacionadas con la elaboración y control de los productos destinados a la alimentación, se constituya una Agencia Española para la Seguridad Alimentaria, con participación de las CC. AA. y con las finalidades siguientes:

- “Articular los mecanismos de cooperación de todas las Administraciones Públicas responsables del control sanitario e higiene de los alimentos, asegurando sistemas homogéneos de inspección y control, así como mantener actualizados los conocimientos técnicos y científicos en materia de higiene y control alimentario y de nutrición.
- Mantener las relaciones técnicas y científicas que fueran pertinentes de acuerdo con el sistema competencial con los organismos similares de la UE y sus Estados miembros.
- Promover la actualización de la normativa básica sanitaria en materia de alimentos.
- Y, en general, cuantas otras faciliten la salud y seguridad alimentaria de los ciudadanos”.

Mientras tanto, se ha creado una Comisión Interministerial con competencias en relación con la seguridad alimentaria.

BIBLIOGRAFÍA

Anónimo. 1998. Listing of specified risk materials: a scheme for assessing relative risks to man. Opinion of the Scientific Steering Committee adopted on 9 December 1998

Anónimo. 2000. Final Opinion of the Scientific Steering Committee on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR). Adopted on 6/July/2000 <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out113> en.pdf

Anónimo. 2000. Report on the Assessment of the Geographical BSE Risk (GBR) of Spain. July 2000 <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out113> en.pdf

Anónimo. 2000. Agencia Europea de Seguridad Alimentaria. *Inf. Vet.*, 217:1-4

Anónimo. 2000. Información Europea IP/00/1270

Anónimo. 2000. Legislación Alimentaria de la granja al consumidor; creación de una Autoridad Alimentaria Europea. IP/00/1270

Anónimo. 2000. Final opinion of the Scientific Steering Committee on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR). Adopted on 6/July/2000

Anónimo. 2000. Report on the Assessment of the Geographical BSE Risk (GBR) of Spain. July 2000

Anónimo 2001. El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha dado a conocer un informe sobre la EEB. Medidas para la erradicación de la encefalopatía espongiforme bovina en España. *Cárnica* 2000. Abril 2001, 2228

Boletín Oficial de las Cortes. Propuesta de Resolución para la creación de una Agencia de Seguridad Alimentaria. Núm. 715, de 20 de julio de 1999.

Brown, P. 2000. BSE and transmission through blood *Lancet*, 356(9234):955-956

Brown, P., Rau, E.H., Johnson, B.K., Bacote, A.E., Gibbs, C.J. & D.C. Gajdusek. 2000. New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent_ threshold survival after ashing at 600°C suggest an inorganic template of replication *PNAS*. 97:3418-3421

Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & C.J. Bostock. 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent *Nature*, 389(6650):498-501

Collinge, J. 2001. Prion diseases of humans and animals: their cause and molecular basis. *Annu.Rev. Neurosci.*, 24:519-550.

Comisión de las Comunidades Europeas. Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria. Bruselas 12.1.2000 (COM-1999- 719 final).

Decisión 94/381/UE sobre prohibición de harinas de carne y huesos de mamíferos para la alimentación de los rumiantes

Decisión 96/239/UE sobre comercio de ganado vivo en relación con la EEB

Decisión 96/449/UE, sobre tratamiento térmico inactivante de animales muertos y decomisos

Decisión 97/534/UE, sobre tratamiento e inactivación de materiales peligrosos (MER)

Decisión 2000/373/CE sobre diagnóstico de EEB

Decisión 2001/2/CE, sobre la lista de MER

Department of Health Monthly Creutzfeldt-Jakob Disease Statistics.
<http://www.doh.gov.uk/apil01.htm>

DOH-MAFF. Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance in the United Kingdom. Fourth Annual Report. August 1995. National CJD Surveillance Unit. Western General Hospital. Edinburgh.

Fisher, M.B., Roeckl, C., Parizek, P., Schwarz, H.P. & A. Aguzzi. 2000. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature*, 408(6811):479-483

Gómez Lucia, E., Ortiz, G. & I. Mateo. 2001. El 'mal de las vacas locas'. Revisión bibliográfica. Bol. ANEMBE. 32, 1-4

Hadlow, W.J., Kennedy, R.C. & R.E. Race. 1982. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J. Infect. Dis.*, 146:657-664

Hadlow, W.J., Race, R.E., Kennedy, R.C. & C.M. Eklund. 1979. Natural infection of sheep with scrapie virus. In: S.B. Prusiner & W.J. Hadlow (Eds). *Slow transmissible diseases of nervous system*. Vol. 2. Academic Press, London. 312.

Heim, D., Detwiler, L., Williams, E. & U. Kihm. 2001. Situación actual de la encefalopatía espongiforme bovina, el prurigo lumbar y la enfermedad debilitante crónica. OIE. 69 SG/12/CS3 C.

Heye, N., Hensen, S. & N. Muller. 1994. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet*, 343 (8892):298-299

Houston, F., Foster, J.D., Chong, A., Huner, N. & C.J. Bostock. 2000. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*, 356 (9234): 999-1000

Lord Phillips of Worth Matravers, J. Bridgeman CB & M. Ferguson-Smith. 2000. The BSE Inquiry-The Report (Informe Phillips). <http://www.bseinquiry.gov.uk>

Lozano Barriuso, J.J. Informe de las actuaciones realizadas hasta el 31 de mayo de 2001 por la Consejería de Agricultura y Ganadería (Junta de Castilla y León) en el marco del Programa Coordinado de Control y Vigilancia de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles. Valladolid, 1 de junio de 2001.

Lücker, E.H., Eigenbrodt, E., Wenisch, S., Leiser, R. & M. Bülte. 2000. Identification of central nervous system tissue in retail meat products. *J. Food Protect.*, 63:258-263

MAFF- Bovine Spongiform Encephalopathy in Great Britain: a progress report 1987

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Situación en España.
<http://www.eeb.es>

OIE. Documento de apoyo del capítulo 3.2.13 del Código Zoosanitario Internacional de la OIE, relativo a la Encefalopatía Espongiforme Bovina. Enero 1998. Paris.

OIE. 1990. Informe de la reunión sobre encefalopatía espongiforme bovina. Paris, 28-29 set. 1990, 1-28

OIE. 1996. Chapter 2.3.13. Bovine spongiform encephalopathy. IN: Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines. OIE. Paris, Francia. 457-466.

OIE. 2000. Código Zoosanitario Internacional. Paris.

Real Decreto 1911/2000, sobre actuaciones en mataderos en relación con los MER

Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre (BOE de 23 de diciembre) sobre el establecimiento del Programa Integral Coordinado de Vigilancia y Control de las EETs de los animales.

Rodríguez Ferri, E.F., Moreno García, B., Álvarez Martínez, M. & J.F. García Marín. Lo que Vd. Debe saber de los priones y el mal de las vacas locas. Caja España. León, 2001.

SEAC- Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. Statement on maternal transmission. London. 1997

SEAC- Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. Statement on dorsal root ganglia. Department of Health. London. 1997

Susan Brewer, M. 2001. Bovine Spongiform Encephalopathy Food Safety Implications. *Adv. Food and Nutrit. Res.* 43:265-317

Taylor, D.M., Ferguson, C.E., Bostock, C.J. & M. Dawson. 1995. Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.*, 136:592

Taylor, D.M. & S.L. Woodgate. 1997. Bovine spongiform encephalopathy: the causal role of ruminant-derived protein in cattle diets. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 16: 187-198

Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.B., Jeffrey, M., Dawons, M. & R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.*, 121: 419-420

WHO. Report of a WHO consultation on public health issues related to human & animal transmissible spongiform encephalopathies. WHO/CDS/VPH/95.145. Geneva, 17-19 May 1995

Will, R.G, Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. & P.G. Smith. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347:921-925

Willesmith, J.W. Manual on Bovine Spongiform Encephalopathy. FAO Animal Health Manual No.2. Rome, 1998

**ELIMINACIÓN DE HARINAS CÁRNICAS
EN CERÁMICAS**

CONTROL DE LA PRESENCIA DE AMINOÁCIDOS

D. David Ordóñez Escudero

La eliminación de harinas cárnicas como combustible en la fabricación de ladrillos podría mejorar las condiciones termoplásticas del mismo. Las altas temperaturas de cocción llevaría a cenizas toda la materia orgánica si bien se podría sospechar la presencia de aminoácidos dentro de la estructura del mismo.

El trabajo realizado por Intoxcal se ha centrado inicialmente en el desarrollo de un método cualitativo que nos permitiese de forma rápida poder concluir la presencia o ausencia de estos aminoácidos en ladrillos a los que se ha incorporado harinas cárnicas para su fabricación.

La estructura y propiedades ácido-básicas de los aminoácidos están perfectamente descritas. Sus grupos funcionales (α -amino y carboxilo) dan reacciones específicas que permiten su identificación. Así, una de las principales reacciones del grupo α -amino más características y ampliamente utilizada es la reacción de la ninhidrina que puede utilizarse para valorar aminoácidos cualitativamente en cantidades muy pequeñas. El grupo α -amino con dos moléculas de ninhidrina y calor da un pigmento púrpura (púrpura de Ruhemann) intensamente coloreado con un espectro en UV-visible que presenta un máximo de absorción a 405 nm.

Dada la naturaleza fundamentalmente ácida o neutra de los aminoácidos esenciales (sólo arginina, lisina e histidina son básicos) las muestras de ladrillo después de ser trituradas y tamizadas se someten a un proceso de extracción en medio ácido, para posteriormente realizar con el sobrenadante la reacción con la ninhidrina y lectura en visible a 405 nm, donde el complejo ninhidrina-aminoácido presenta el máximo de absorbancia.

Como control de la analítica desarrollada se realiza el mismo procedimiento de extracción con un ladrillo de la dicha fábrica, en el que se han utilizado la misma arcilla e igual proceso de cocción, a excepción de la incorporación de las harinas cárnicas. También utilizamos como segundo control, otro tipo de ladrillo procedente de otra fábrica.

En las tablas de las siguientes páginas se muestran los resultados obtenidos en las distintas pruebas.

La **conclusión** clara que se puede deducir es que la absorbancia a esta longitud de onda en la muestra de ladrillo con harinas cárnicas es mayor que con respecto a los controles. Este ligero aumento de absorbancia podría deberse a la presencia de aminoácidos que reaccionarían con la ninhidrina obteniéndose un complejo coloreado que absorbe a esta longitud de onda.

Evidentemente se trata de un ensayo cualitativo. Sería necesario realizar técnicas más complejas de identificación y cuantificación (HPLC con fluorescencia; secuenciador de aminoácidos, etc) para poder determinar que aminoácidos están presentes y en que cantidad.

ENSAYOS 1 y 2:

Medida de absorbancia a 405 nm después de una extracción en medio ácido y reacción con ninhidrida

Absorbancia Ladrillo Muestra	Absorbancia Ladrillo Control A	Absorbancia Ladrillo Muestra	Absorbancia Ladrillo Control A
1,548	0,848	1,290	0,554
1,601	0,840	1,311	0,549
1,570	0,871	1,292	0,553
1,573	0,875	1,364	0,562
1,581	0,859	1,322	0,555
1,580	0,894	1,335	0,555
1,583	0,865	1,328	0,564
1,584	0,853	1,308	0,554
Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
1,578 ± 0,020	0,863 ± 0,020	1,319 ± 0,020	0,556 ± 0,005

Ladrillo Muestra: Ladrillo fabricado con arcilla y harinas cárnicas

Ladrillo Control A: Ladrillo fabricado con arcilla y en otra fábrica

ENSAYOS 3:

Medida de absorbancia a 405 nm después de una extracción en medio ácido y reacción con ninhidrida

Absorbancia Ladrillo Muestra	Absorbancia Ladrillo Control A	Absorbancia Ladrillo Control B
1,216	0,896	1,092
1,198	0,856	1,054
1,154	0,878	1,041
1,178	0,868	1,045
1,182	0,865	1,056
1,157	0,855	1,044
1,181	0,863	1,063
1,332	0,875	1,071
Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
1,200 \pm 0,057	0,869 \pm 0,013	1,058 \pm 0,017

Ladrillo Muestra: Ladrillo fabricado con arcilla y harinas cárnicas

Ladrillo Control A: Ladrillo fabricado con arcilla y en otra fábrica

Ladrillo control B: Ladrillo fabricado sin harinas cárnicas pero en la misma fábrica

ENSAYOS 4:

Medida de absorbancia a 405 nm después de una extracción en medio ácido y reacción con ninhidrida

Absorbancia Ladrillo Muestra	Absorbancia Ladrillo Control A	Absorbancia Ladrillo Control B
1,308	0,896	1,107
1,244	0,856	1,062
1,222	0,878	1,060
1,210	0,868	1,054
1,209	0,865	1,059
1,214	0,855	1,080
1,227	0,863	1,061
1,249	0,875	1,089
Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
1,235 \pm 0,033	0,869 \pm 0,013	1,065 \pm 0,018

Ladrillo Muestra: Ladrillo fabricado con arcilla y harinas cárnicas

Ladrillo Control A: Ladrillo fabricado con arcilla y en otra fábrica

Ladrillo control B: Ladrillo fabricado sin harinas cárnicas pero en la misma fábrica

ENSAYOS 5:

Medida de absorbancia a 405 nm después de una extracción en medio ácido y reacción con ninhidrida

Absorbancia Ladrillo Muestra	Absorbancia Ladrillo Control A	Absorbancia Ladrillo Control B
0,690	0,526	0,380
0,781	0,514	0,378
0,701	0,511	0,402
0,676	0,539	0,372
0,706	0,534	0,377
0,720	0,547	0,392
0,702	0,548	0,408
0,742	0,540	0,506
Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD
0,715 ± 0,033	0,532 ± 0,014	0,402 ± 0,044

Ladrillo Muestra: Ladrillo fabricado con arcilla y harinas cárnicas

Ladrillo Control A: Ladrillo fabricado con arcilla y en otra fábrica

Ladrillo control B: Ladrillo fabricado sin harinas cárnicas pero en la misma fábrica

ENSAYOS 6:

Medida de absorbancia a 405 nm después de una extracción en medio ácido y reacción con ninhidrida

Absorbancia Ladrillo Muestra	Absorbancia Ladrillo Control A	Absorbancia Ladrillo Control B
0,688	0,576	0,450
0,678	0,523	0,422
0,673	0,642	0,445
0,699	0,577	0,437
0,690	0,597	0,486
0,678	0,638	0,522
0,693	0,565	0,420
0,676	0,558	0,436
Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
0,684 \pm 0,009	0,582 \pm 0,036	0,452 \pm 0,035

Ladrillo Muestra: Ladrillo fabricado con arcilla y harinas cárnicas

Ladrillo Control A: Ladrillo fabricado con arcilla y en otra fábrica

Ladrillo control B: Ladrillo fabricado sin harinas cárnicas pero en la misma fábrica

**APROVECHAMIENTO ENERGÉTICO DE LAS
HARINAS DE CARNE**

Profesor GREGORIO GIRALDO ANTOLÍN

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	153
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS COMO COMBUSTIBLE	154
2.1 Conclusiones.....	160
3. EXPERIENCIAS EN CERÁMICAS	164
3.1. Como combustible	164
3.2. Como aditivo en la masa de piezas cerámicas.....	166
4. CONCLUSIONES FINALES	169
5. ANEXOS	170
- <u>Anexo 1</u> : Símbolos utilizados.....	170
- <u>Anexo 2</u> : Legislación utilizada.....	170

1. INTRODUCCIÓN

El problema de la EEB (Encefalopatía Espongiforme Bobina) no hade limitarse a la búsqueda de soluciones sanitarias. También hay que considerar el tratamiento de los residuos generados en el sistema productivo vacuno, MER y harinas cárnicas, cada uno con su tratamiento específico. Tanto los Materiales de Alto Riesgo (MAR), definidos según el RD 2224/1993, como los Materiales Específicos de Riesgo (MER), definidos por el RD 1911/2000, deben ser considerados como residuos peligrosos.

Es previsible que las Harinas de Carne y Hueso (HCH) procedentes de los MAR puedan estar contaminadas con MER, por ello, tanto las HCH procedentes de los MAR como de los MER deberán ser destruidas y en el proceso garantizar su no retorno a la cadena alimentaria.

Las posibilidades actuales son:

- Fabricación de abonos con las HCH mediante compostaje o por hidrólisis a alta temperatura
- Valorización energética mediante incineración o coincineración de las HCH, directamente o previa gasificación biológica o térmica
- Eliminación en plantas de incineración, sin aprovechamiento energético
- Eliminación en vertederos de residuos

Hay países, como Gran Bretaña, que han optado por la gestión de las harinas enfocada única y exclusivamente hacia su eliminación. Para ello, han concebido una tecnología basada en la reducción o anulación del posible impacto ambiental ocasionado por dicho proceso. Una de las tecnologías utilizadas en el citado país es la **combustión en lecho fluidizado**, adicionando un 50% de agua a la harina para estabilizar el lecho.

Sin embargo, en España se ha planteado ir mas allá de la simple eliminación de las harinas, buscando además un beneficio energético, que pueda aminorar el coste de su eliminación. De esta forma, sería económicamente más viable su tratamiento. Las **acciones previstas** en la legislación son:

1. **Eliminación en cementeras**
2. **Eliminación en cerámicas**

3. **Revalorización energética en centrales térmicas convencionales**
4. **Revalorización energética en instalaciones diseñadas específicamente para tal fin**

De las cuatro alternativas previstas se ha considerado más viable, por razones técnico-económicas, la eliminación en cerámicas. Esta serie de razones se irán exponiendo a lo largo del informe. Para ratificar esta alternativa, se han realizado una serie de experiencias en cerámicas para así poder determinar el comportamiento de las harinas desde dos puntos de vista: como combustible de apoyo en el proceso térmico de cocción de las piezas cerámicas y como aditivo en la masa de las piezas cerámicas (ladrillos, tejas, etc.).

Otra alternativa también a considerar es el desarrollo de tecnologías específicas para la gestión de las harinas que contemplan los objetivos indicados, destacando la combustión en lecho fluidizado de harinas mezcladas con restos agroforestales (muy abundantes en nuestra Región). Este objetivo se pretende analizar a corto plazo mediante la adaptación de esta tecnología en una planta de cogeneración que, sin duda, reportaría beneficios socioeconómicos a la Región de Castilla y León. Con este fin se pretende estudiar en planta piloto todos los parámetros que pudieran afectar al proceso para su adecuación y optimización.

En todo caso, será siempre necesario considerar el posible **impacto ambiental**. Para ello, se deben incorporar las medidas de diseño o correctoras de los procesos seleccionados, adaptando las tecnologías existentes o desarrollando otras nuevas para alcanzar dicho objetivo.

2. CARACTERIZACIÓN DE LAS HARINAS COMO COMBUSTIBLE

Antes de proceder a quemar las harinas se ha creído conveniente caracterizarlas como combustible, dedicando este apartado a presentar los resultados obtenidos en la caracterización de las harinas animales y de las cenizas obtenidas tras su combustión. Los métodos de ensayo utilizados son los de la normativa vigente (ver tabla 1):

TABLA 1**Métodos empleados para llevar a cabo la caracterización de las harinas de carne**

Parámetro	Método de ensayo
Humedad	Secado a 105 °C y gravimetría
Residuo a 100 °C	Secado a 105 °C y gravimetría
Densidad	Medida gravimétrica de un volumen conocido
Granulometría	Tamizado combinado, automático y manual
Análisis molecular (Al ₂ O ₃ , SiO ₂ , Fe ₂ O ₃ , TiO ₂ , SO ₃)	Espectrometría FRX
Análisis elemental (Ca, Na, K y Mg)	Digestión ácida y medida por Espectrometría atómica
Fósforo total	Digestión ácida y medida colorimétrica
Cloruro	Digestión ácida y medida potenciométrica
Insoluble en HCl	Digestión en placa y gravimetría

Las condiciones bajo las que se han llevado a cabo los diferentes análisis de las HCH son las siguientes:

- Humedad, residuo seco y densidad: Se realizaron sobre la muestra, en las condiciones en que se recibió.
- Análisis moleculares: Se realizaron sobre la muestra calcinada a 950 °C y se refieren a esta fracción.
- El resto de análisis: Se realizó sobre la muestra seca a 105 °C y se refieren a esta fracción (fracción seca).

En todos los casos el ensayo se llevóa cabo en atmósfera oxidante con exceso de Q.

Las tablas 2 y 3 muestran los datos experimentales obtenidos en la caracterización de las harinas de carne como combustible.

TABLA 2**Caracterización de harinas de carne (muestra 1)**

Parámetro	Contenido
Humedad (% masa)	5,7
Densidad (g/cm ³)	0,53
Pérdida por calcinación (% masa) (materias volátiles)	72,7
Cenizas (% masa)	27,3
Cl (g/kg)	7,4
Al ₂ O ₃ (% masa)	6,11
SiO ₂ (% masa)	35,52
Fe ₂ O ₃ (% masa)	2,21
TiO ₂ (% masa)	0,29

Fuente: Ingenieros Asesores, S.A.

TABLA 3**Caracterización de harinas de carne (muestras 2 a 4)**

Parámetro	Resultados	
	S/seco	S/bruto
Humedad secado al aire (% masa)		0,2-1,1
Humedad Higroscópica (% masa)		2,5-4
Humedad total (% masa)		2,8-5
Materias Volátiles (% masa)	68-78	65-76
Cenizas (% masa)	13-25	13-24
Carbono (% masa)	41-52	40-50
Hidrógeno (% masa)	6-7,5	6,5-7,5
Nitrógeno (% masa)	8,5-9,5	8,5-9,5
Azufre (% masa)	0,3-0,8	0,3-0,8
Poder calorífico sup., (PCS _v) (kcal/kg)	4.700-5.800	4.700-5.800
Poder calorífico inf., (PCS _p) (kcal/kg)	4.400-5.400	4.100-5.200

Fuente: LARECOM

En la tabla 3 se recogen los valores extremos de los análisis realizados a tres muestras de harina de carne.

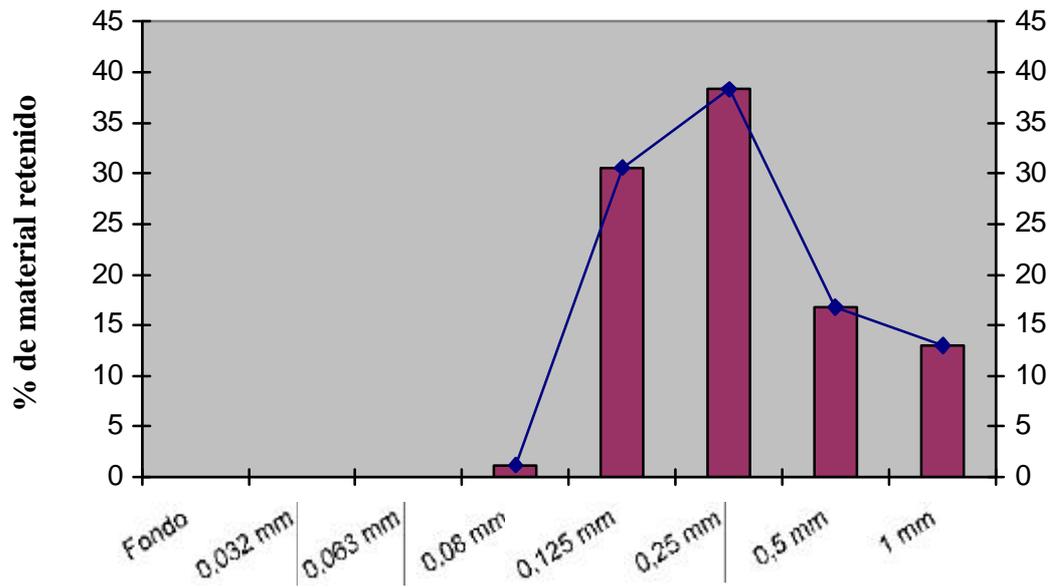
La tabla 4 muestra la distribución granulométrica de una muestra de harina al pasar por tamices de diferentes tamaños de malla.

TABLA 4
Análisis granulométrico de la harina de carne (muestra 1)

Granulometría	% Material Retenido	% Material acumulado
Tamiz 1 mm	13,1	13,1
Tamiz 0,5 mm	16,8	29,9
Tamiz 0,250 mm	38,3	68,2
Tamiz 0,125 mm	30,6	98,8
Tamiz 0,080 mm	1,2	100
Tamiz 0,063 mm	-----	-----
Tamiz 0,032 mm	-----	-----
Fondo	-----	-----

Fuente: Ingenieros Asesores, S.A.

Grafico 1
Distribución granulométrica



Fuente: Ingenieros Asesores, S.A.

Los datos obtenidos de los análisis químicos realizados a las cenizas resultantes de la combustión de algunas muestras de harinas en horno de mufla, se recogen en la tabla 5 y 6.

Tabla 5
Caracterización de cenizas de harinas de carne (muestra 1)

Parámetro	Contenido
Ca (g/Kg)	96,10
P (g/Kg)	64,50
Na (g/Kg)	18,50
K (g/Kg)	26,40
Mg (g/Kg)	47,70
Cl (g/Kg)	10,00
Al ₂ O ₃ (%masa)	5,88
SiO ₂ (% masa)	33,80
Fe ₂ O ₃ (% masa)	2,01
TiO ₂ (% masa)	0,06
SO ₃ (% masa)	0,34
Pérdida por calcinación(% masa)	3,40
Insoluble en HCl (% masa)	48,00

Fuente: Ingenieros Asesores, S.A

En la tabla 6, al igual que en la tabla 3, se recogen los valores extremos de las tres muestras de harina de carne analizados en el LARECOM.

TABLA 6
Caracterización de cenizas de harinas de carne (muestra 2 a 4)

Parámetro	Contenido (% masa)
SiO ₂	2-9
Al ₂ O ₃	<0,1
Fe ₂ O ₃	0-1
CaO	30-45
MgO	0-1,5
Na ₂ O	3-7
K ₂ O	0-1,5
MnO	0-0,05
TiO ₂	0-0,4
P ₂ O ₅	30-45
SO ₃	0-0,9

Fuente: LARECOM

Conclusiones

De los resultados obtenidos de la caracterización de las cenizas como combustible se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Su bajo contenido en humedad (2,8 a 5,7%) que contribuirá a una mayor eficacia del proceso de combustión y, por tanto, a una reducción de las posibles emisiones de inquemados en los humos, para tamaños de partículas de bajo tiempo de residencia en el hogar.

También repercutirá este factor en un mayor rendimiento del proceso de combustión y como consecuencia en una mayor rentabilidad de su uso como combustible, ya que no hay que evaporar el agua de la humedad.

- Alto contenido en cenizas (13 a 27,3%) factor que hará necesaria una mayor frecuencia del proceso de extracción de cenizas en una planta normal de combustión en hogar o diseñar un cenicero de gran volumen.

Este parámetro hace que se pueda pensar en procesos térmicos, en los que las cenizas no sea necesario retirarlas del hogar, actuando como aporte de materia prima del proceso, una vez incinerada la harina. Tal situación se puede presentar en las cementeras o cerámicas, donde se podrán incorporar estas cenizas al clinker del cemento o a la masa de las piezas cerámicas.

Esta incorporación de las cenizas al producto fabricado en el proceso, garantizaría la no producción de residuos secundarios derivados de las HCH, asegurando la o introducción de algún prion no destruido nuevamente en la cadena alimentaria, lo cual podría ocurrir por arrastre de lixiviados en un vertedero donde se depositasen las cenizas.

Parece claro que, ante la diferencia del contenido de cenizas en las muestras analizadas, donde algunas muestras duplican a otras, se está adicionando algún inerte, como puede ser arena, para aumentar su peso. Esto se ve refrendado en el contenido de SiO₂ de la tabla 5, correspondiente a las cenizas de la muestra 1, donde su alto contenido confirma la adulteración de las harinas con arena.

No cabe duda de que el contenido en cenizas de las harinas de carne podrá variar, dependiendo de la proporción de huesos y carne de la muestra tratada, pero en ningún caso se considera que se pueda alcanzar el valor de 27,3% de la tabla 2.

- Homogeneidad granulométrica y distribución mayoritaria entre 0,1 y 1mm que favorecerá su combustión por la gran superficie específica existente entre el combustible y el comburente.

Su pequeño tamaño puede hacer que las partículas de menor diámetro sean arrastradas fuera del hogar sin combustionar (inquemados), debiendo existir sistemas de depuración de humos para evitar tal fin, ya que su salida a la atmósfera podría hacer que fuesen incorporados nuevamente a la cadena alimenticia al caer al suelo y ser asimilada por un animal. Podrá también incorporarse a la cadena alimenticia a través del sistema respiratorio.

No cabe duda de que el mejor sistema de retención de pequeñas partículas en los humos (inquemados) es por vía húmeda, tipo scrubber, razón por la que los ingleses han decidido mezclar las harinas con un 50% de agua en el proceso de combustión.

Hay que tener en cuenta que este reducido tamaño de las partículas de las harinas, junto con su baja humedad, hace que la tecnología de los procesos de combustión asegure una oxidación rápida del combustible para evitar su arrastre como inquemado en los humos, o bien se incremente su tiempo de retención en el hogar para facilitar su total oxidación.

Por su pequeño tamaño y su homogeneidad de diámetros, se podría pensar en quemarlas mediante un quemador ciclónico, el cual transforma en gas el combustible pulverulento con que se alimenta, mediante un proceso de pirólisis a temperaturas próximas a 1200°C. Este gas serviría de combustible para una caldera, que actuaría como una cámara de postcombustión, donde se aseguraría su total eliminación al superarse las condiciones mínimas de temperatura de 850°C y del tiempo de residencia de 2 segundos.

Este sistema de combustión en dos etapas está altamente experimentado y existen equipos comerciales para tal fin.

- Bajo contenido de cloro (7,4‰), que además se encontrará en forma de cloruro sódico en su mayoría, siendo retenido casi todo en las cenizas, después de su incineración de las harinas, en forma de sales inorgánicas. No es probable que el cloro de las HCH esté en forma de compuestos organoclorados, que sería el paso previo para formarse dioxinas y/o furanos.

Este bajo contenido asegurará la dificultad de formarse dioxinas o furanos durante el proceso de combustión de las harinas, asegurándose, en todo caso, la no superación de los límites permitidos en las emisiones de gases a la atmósfera para estos compuestos altamente peligrosos.

La nueva Directiva de incineración de residuos (2000/76/CE), que aún no ha sido traspuesta, sólo impone condiciones especiales cuando un combustible supera el 1% en contenido de cloro orgánico, que no es el caso de las HCH.

Para confirmar este hecho se han incorporado a este informe los resultados de los contenidos en dioxinas y furanos en los humos de combustión de harinas de carne en cerámicas (ver tablas 7 y 8).

- Altos contenidos de fósforo y calcio que procederán en su mayoría de la constitución de los huesos de los animales.

El alto contenido en calcio de las harinas las hará muy adecuadas para su adición al clinker del cemento o en las piezas cerámicas.

Sin embargo, la alta proporción de fósforo en las harinas podrá limitar la adición de las harinas al clinker del cemento para no influir o modificar su proceso de fraguado, que se podría retardar. Se considera que en proporciones inferiores al 10%, que es como se quiere adicionar en las cementeras, no afectarán en gran medida.

- Alto poder calorífico, que se puede asemejar al 40% de un combustible derivado del petróleo.

Esto hace que en caso de poder aprovechar su contenido energético en un proceso industrial, se pueda recuperar fácilmente el coste derivado de su gestión.

Su alto poder calorífico puede hacer atractivas a las harinas de carne como combustible para aquellos procesos industriales, donde la tecnología asegure su total eliminación, pudiendo reducir o anular el pago de primas a las industrias que lo empleen.

Podría considerarse que cada 2,5 kg de harinas de carne sustituirían a 1kg de un combustible derivado del petróleo.

- Tecnologías recomendadas para su revalorización energética

Está claro, de todo lo concluido anteriormente, que el tipo de tecnología más adecuada para la incineración de harinas de carne será aquel que cumpla una serie de condiciones mínimas de operación:

a) Rápida oxidación del combustible o alto tiempo de residencia de las partículas en el hogar.

Evitaría la salida de inquemados en los humos a la atmósfera.

b) Sistemas de retención de partículas en los humos de alta eficacia. Podrían ser filtros electrostáticos o de vía húmeda.

Los tratamientos de gases por vía húmeda podrían ir acompañados por tratamientos químicos, esto es el caso de disoluciones acuosas de NaOH. Este tratamiento químico de los humos, al ser precedido del tratamiento térmico de las harinas en el hogar de combustión, aseguraría la nula emisión a la atmósfera de inquemados o su total inertización en último caso.

La experiencia ha demostrado que ningún prion aguanta el doble tratamiento indicado anteriormente sin ser destruido. Este doble tratamiento ha sido recomendado por los expertos de la UE como el más seguro, lo que aseguraría la nula emisión de inquemados a la atmósfera y/o su inertización.

La combinación de las condiciones a) y b) aseguraría la total eficacia de los sistemas de eliminación de harinas de carne mediante procesos de combustión.

c) Incorporación de las cenizas al producto final del proceso para evitar su deposición en vertederos y así su alto coste de transporte derivado de su gran contenido en las HCH. También se aseguraría que los lixiviados no pudiesen reintroducir los priones en la cadena alimenticia.

Se aseguraría el enclaustramiento de los restos inertes de las harinas de carne y su salida definitiva de la cadena alimenticia.

d) Seguridad de que en el hogar, donde se incineren las harinas, se alcancen temperaturas superiores a 850°C durante al menos 2 segundos en atmósferas de oxígeno abundante.

Esto aseguraría la eliminación de las dioxinas y/o furanos que se pudiesen formar en el proceso de combustión.

Teniendo en cuenta todas estas condiciones, que se deberían exigir a la tecnología que se utilice, se reducen mucho las posibilidades de seleccionar una tecnología adecuada para el caso de aprovechar energéticamente las harinas. Se considera que hay dos que cumplen estos requisitos mínimos:

- Utilización en cementeras
- Utilización en cerámicas:
 - Como combustible
 - Como aditivo en la masa

La incineración en cerámicas, empleando las HCH como aditivo a la masa de piezas cerámicas, es la que consideramos más segura ya que no se producirían residuos secundarios y las emisiones de NO_x serían bajas.

Las cementeras emitirían más óxidos de nitrógeno que las cerámicas al operar a temperaturas más altas, procediendo éstos de las proteínas animales (casi el 60% de la masa de las HCH son proteínas) y del nitrógeno del aire.

3. EXPERIENCIAS EN CERÁMICAS

3. 1. Como combustible

Se han realizado experimentos utilizando harinas animales como combustible biomásico de un horno. Los equipos empleados para realizar mediciones de los gases emitidos durante la combustión son:

- **Unidad de medida isocinética** marca NAPP, modelo 31 con sonda normalizada de 1 m de longitud.
- **Equipo Bacharach Fyrite** para la determinación del porcentaje de CO_2 y O_2 del gas.

La medición de dioxinas y furanos emitidos se ha llevado a cabo en la chimenea de extracción de gases del horno de la cerámica. Dichas medidas deben ser realizadas en el momento en el que el horno alcanza y mantiene **1.050 °C de temperatura**. La instalación se acondicionó especialmente para poder realizar las tomas de muestra cumpliendo la normativa de **isocinetismo** existente (IA – ITCAM – 15.3 – 02 “Medidas isocinéticas de emisión en fuentes estacionarias”).

Los resultados de las medidas realizadas se incluyen en la tabla 7. Los resultados indican que las emisiones de dioxinas y furanos están por debajo de los límites establecidos

por la Legislación para instalaciones de incineración de residuos peligrosos **Real Decreto 1217/1997**.

TABLA 7
Resultados de las medidas de emisiones gaseosas en cerámica

Parámetros	Valores	Límite
Temperatura Gases (°C)	132	----
O ₂ (% masa)	2	----
CO ₂ (% masa)	19	----
Humedad (% masa)	5,9	----
Velocidad (m/s)	2,86	----
Caudal Gas C.C. (m ³ /h)	8.413	----
Caudal Gas base húmeda (Nm ³ /h)	5.338	----
Caudal Gas base seca (Nm ³ /h)	5.022	----
Concentración dioxinas y furanos (pg/Nm ³)	7,94	100 ^A
Isocinetismo (%)	99	----

Nota: C.C.-Condiciones del conducto

A: Valor Límite establecido en el RD 1.217/1997, sobre incineración de residuos peligrosos.

Fuente: Ingenieros Asesores, S.A

Además de analizar la concentración total de dioxinas y furanos emitidos **7,94 pg/Nm³**, se han determinado individualmente aquellos que son más peligrosos y que están especificados por la legislación como compuestos cancerígenos.

En la tabla 8 indica el contenido de los policlorodibenzop-dioxinas (**PCDDs**) y policlorodibenzofuranos (**PCDFs**) de mayor riesgo.

TABLA 8
Concentraciones de dioxinas y furanos en equivalentes tóxicos internacionales (I-TEQ)

Nombre	I-TEQ (pg/Nm ³)
2,3,7,8-TCDF	2,09
1,2,3,7,8-PeCDF	0,29
2,3,4,7,8-PeCDF	2,80
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,65
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,25
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,19
1,2,3,7,8,9-HxCDF	-----
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,05
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,00
Subtotal PCDF I-TEQ	6,33
2,3,7,8-TCDD	0,93
1,2,3,7,8-PeCDD	0,66
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-----
1,2,3,6,7,8-HxCDD	-----
1,2,3,7,8,9-HxCDD	-----
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,03
OCDD	0,01
Subtotal PCDD I-TEQ	1,62
Total PCDD/PCDF I-TEQ	7,94

Nota: Para los cálculos de los equivalentes tóxicos se han utilizado factores tóxicos internacionales

Fuente: Laboratorio de análisis de dioxinas de Barcelona, CSIC

3. 2. Como aditivo en la masa de piezas cerámicas

Otra de las alternativas analizadas ha sido la adición de un determinado porcentaje de harinas a la masa de futuras piezas cerámicas. A priori, se contaba con estudios realizados sobre la mejora de las condiciones físicas de los ladrillos que tenían una parte de materia orgánica (orujillo de aceituna) en su composición original.

Las experiencias se han llevado con proporciones de harinas de carne del 10 y del 20% en la masa de fabricación de las piezas cerámicas.

La causa de dicha mejora está relacionada con la **incineración indirecta** del material orgánico incorporado a la masa de fabricación de la pieza cerámica, al se sometida a temperaturas siempre superiores a **900 °C** y en algún caso de 1100 °C, durante más de **6 horas**, provocando la combustión completa de dicha materia orgánica, quedando piezas cerámicas más porosas. Está claro que las emisiones de inquemados serán más o inferiores a las originadas por la incineración directa, al estar la partícula de harina prisionera en el interior de la pieza cerámica.

Mediante esta forma de incinerar las HCH se asegura la nula emisión de inquemados al estar retenidas en la pieza cerámica, obligando a que durante altos tiempos experimenten altas temperaturas y se inerticen. Tampoco se producen residuos secundarios.

No se consideró necesario, en esta experiencia, analizar las emisiones por chimenea, ya que si en el caso de la combustión directa de las harinas de carne en cerámicas no se superan los límites permitidos para ningún compuesto, está claro que mucho menos en este caso, dado su encerramiento en la estructura de la pieza cerámica.

Para confirmar la nula influencia de las HCH adicionadas a la masa cerámica en las propiedades de los materiales cerámicos finales se procedió a analizar una muestra de ladrillos huecos fabricados con mezclas del 10 y del 20% de harinas de carne.

Los parámetros analizados a una muestra de ladrillos cerámicos huecos, con dimensiones 250x110x80 mm, han sido de **resistencia a la compresión, absorción de agua, succión y masa** de las piezas cerámicas. Los resultados obtenidos son los indicados en la tabla 9:

TABLA 9
Características físicas de los ladrillos huecos

Característica	Resultado	Límite
Resistencia a compresión (kp/cm ²)	56	50 ^A
Absorción de agua (% masa)	21,3	-----
Succión (g/cm ² , min)	0,18	0,10 ^B
Masa (g)	1.867	1.800 ^C

Nota: A: La Norma UNE 67.019 EX indica que se debe superar el valor de Φ .

B: La Norma UNE 67.019 EX indica que si se supera el valor de 0,10, el ladrillo ha de humedecerse antes de su colocación para no perturbar el fraguado y adherencia del mortero.

C: La Norma UNE 67.019 EX indica que la masa mínima para esas dimensiones ha de ser de 1.800 g.

Como puede observarse, los parámetros de comportamiento de los ladrillos por adición de harinas a la masa de fabricación siguen estando dentro de los rangos necesarios para una adecuada calidad del producto cerámico.

También se ensayó el corte del ladrillo con la paleta de un albañil, comprobándose su más fácil y preciso corte, dada su mayor porosidad y elasticidad.

Otra ventaja que se puede derivar de esta aplicación es la reducción de costes del proceso de fabricación de las piezas cerámicas y, por tanto, una mayor competitividad de la empresa cerámica.

a) La necesidad de combustible para el horno de cocción se reduce en la cuantía que aporta la harina de carne al quemarse en el interior de la pieza.

b) La reducción de arcilla para fabricar cada pieza repercute en un menor coste de materia prima ($\approx 10\%$ o la cantidad adicionada de harina).

c) Reducción del coste del transporte al llevar en un camión mayor cuantía de piezas por ser de menor densidad.

También las piezas cerámicas se ven mejoradas técnicamente en otras propiedades:

d) Mayor aislamiento de los muros por ser más porosos los ladrillos. El aislamiento favorece las menores pérdidas de calor y el menor impacto del ruido externo al edificio.

e) Mayor rendimiento en su colocación en los muros al romperse menos, por ser más elásticos y por ello tener menos pérdidas en cascotes.

Para finalizar, cabe significar que como se desconocen las reacciones secundarias que se podrían originar a largo plazo en los materiales donde se incorporen las cenizas de las HCH, caso del cemento o piezas cerámicas, sería recomendable adicionar estas cenizas

al proceso de fabricación de piezas no portantes. Es decir, que no soporten la resistencia de los edificios por si se llegase a producir un efecto como el de la ~~l~~uminosis en el cemento. Por ello sería conveniente incorporar los HCH a ladrillos tabiqueros o piezas para bóvedas (bovedillas).

4. CONCLUSIONES FINALES

Se puede aprovechar el potencial energético acumulado en las harinas de carne para reducir sus costes de gestión, siempre que se utilicen las tecnologías adecuadas con sistemas que eviten las emisiones a la atmósfera de inquemados y aseguren la no emisión de dioxinas y furanos, y no generen residuos secundarios (cenizas).

La incineración de las HCH en cementeras o en cerámicas es adecuado, pudiendo ser mayores las ventajas técnicas y económicas en el caso de las cerámicas, sobre todo si se usa como aditivo en la masa.

Está claro que la utilización de las harinas de carne, como aditivo a la masa de piezas cerámicas, es el procedimiento más seguro en cuanto a la total eliminación de las proteínas enfermas de la cadena alimentaria, al actuar la pieza como un cementerio y asegurar su total destrucción en el proceso de cocción. Esto se debe a que se superan ~~l~~ valores mínimos de temperatura, tiempo de permanencia en el interior del horno de incineración y abundancia de oxígeno en el comburente.

5. ANEXOS

5.1. Símbolos utilizados

CC: Condiciones del conducto.

C.N.: Condiciones Normales (T=0 °C y P=1 atm).

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

EEB: Encefalopatía Espongiforme Bobina.

I-TEQ: Equivalente Tóxico Internacional.

LARECOM: Laboratorio Regional de Combustibles de Castilla y León.

ng: nanogramos (10^{-9} g)

Nm³: Metros cúbicos medidos en Condiciones Normales (T=0 °C y P=1 atm).

PCDD: Policloro Dibenzo-p-dioxinas.

PCDF: Policloro Dibenzo furanos.

PCI: Poder Calorífico Inferior.

PCS_p: Poder Calorífico Superior a presión constante.

PCS_v: Poder Calorífico Superior a volumen constante.

pg: Picogramos (10^{-12} g)

5.2. Legislación vigente

La legislación a tener en cuenta es:

- **Directiva 2000/76 CE**, de 4 de diciembre de 2000, publicada el 28 de diciembre de 2000 L332/91. Aún no se ha realizado la transposición a la legislación española.

- **RD 1911/2000** de 24 de noviembre, por el que se regula la destrucción de los materiales especificados de riesgo en relación con las encefalopatías espongiformes transmisibles (publicado en el BOE de 25 de noviembre de 2000).

- **LEY 10/1998**, de 21 de abril, de residuos (publicada el 22 de abril de 1998).

- **RD LEY 4/2001**, que cambia la LEY anterior (10/1998), especialmente en los puntos de Procedimiento Administrativo sobre licencias, descatalogación de las harinas como residuo peligroso y su valorización energética.

- **RD 1217/1997**, de 18 de julio, sobre incineración de residuos peligrosos y de modificación del RD 1088/1992, de 11 de septiembre, relativo a las instalaciones de incineración de residuos municipales.

**REPERCUSION ECONOMICA DE LA CRISIS DE LA E.E.B.
EN CASTILLA Y LEON**

José Fernández Revuelta

1.- INTRODUCCIÓN Y METODOLOGÍA

En Abril del año 2000 el gobierno inglés, en la experiencia más seria de valoración económica de esta enfermedad, estimó el coste neto total de la crisis de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) hasta finales del ejercicio 2000-2001 en 3,7 mil millones de libras esterlinas (más de un billón de pesetas) (Informe Phillips). Este coste fue soportado por el sector público y privado desde el año 1996 en que se inició el proceso. Estas cifras dan una indicación de la importancia económica del impacto que ha causado la enfermedad en las sociedades a las que ha afectado.

En España la crisis de la EEB se inicia a finales del año 2000 y, en ella, se evidencian los mismos síntomas que antes se habían apreciado en el Reino Unido. El objetivo de este trabajo es analizar el impacto económico que la enfermedad ha tenido en la Comunidad de Castilla y León, una de las más afectadas por la enfermedad, con 9 casos diagnosticados.

Naturalmente, los aspectos económicos de la enfermedad tienen relación con las actuaciones de respuesta de la Administración Pública y la industria. El sector más importante afectado fue el sector de la carne de vacuno que representa el 12,57 % de la producción total agraria de Castilla y León, dando actividad a muchos miles de personas, normalmente en explotaciones de tamaño pequeño o medio.

Aunque la preocupación por la enfermedad es evidente desde que se desató la crisis en el Reino Unido, lo que se evidencia en conferencias, cursos y otras manifestaciones referentes a la enfermedad llevados a cabo en los últimos 6 años, es también bastante claro que el impacto económico causado por la misma en España y en Castilla y León era relativamente marginal hasta que se desató la crisis en el continente (Francia y Alemania) y en particular hasta que aparecen los primeros casos en Galicia, a finales del año 2000, y en Castilla y León, confirmados a primeros del presente año 2001.

En este informe se analiza el impacto en el sector público con un análisis de los costes incurridos por parte de la Administración Pública (Ministerios, Consejerías Administraciones locales, etc) en respuesta a la aparición de la EEB.

A efectos metodológicos, es necesario resaltar que los costes, a menos que se indique lo contrario, se refieren a precios corrientes, es decir no se han realizado ajuste con la inflación.

2.- BASE LEGAL DE LAS ACTUACIONES LLEVADAS A CABO

2.1.- Distribución de competencias

Unión Europea: A la Unión Europea le corresponden las siguientes competencias resumidas:

- Adopción de la normativa correspondiente
- Cofinanciación de las medidas de intervención del mercado y parte del coste de las pruebas laboratoriales
- Realización de controles o auditorías en los Estados miembros mediante misiones de inspección de la Oficina Alimentaria y Veterinaria (OAV)

***Administración General del Estado:* Su actividad se enmarca legalmente en las siguientes acciones:**

- Coordinación de actuaciones de las Comunidades Autónomas (Laboratorios Nacionales de Referencia)
- Ordenación de la economía del sector
- Intervención de mercados a través del FEGA

***Comunidades Autónomas:* Tienen la mayor parte de la actividad ejecutiva; en particular deben realizar las siguientes acciones**

- Ejecución de las medias adoptadas y control de su adecuada aplicación
- Garantizar la sanidad humana, sanidad animal y medio ambiente.

***Administración local.* Su cometido legal es el siguiente:**

- Responsabilidad de los mataderos en municipios de más de 20000 habitantes
- Recogida de residuos en todos los municipios
- Tratamiento de residuos y mercados en municipios de mas de 5000 habitantes
- Protección del medio ambiente en municipios de más de 50000 habitantes

2.2.- Normativa Administrativa

A efectos económicos la normativa administrativa establecida, procede tanto de la Administración Central como de la Autonómica. En el caso de la Central tiene su origen en los Ministerios de Presidencia, Agricultura y Alimentación y Sanidad y Consumo.

3.- ACTUACIONES ESPECÍFICAS LLEVADOS A CABO EN CASTILLA Y LEÓN Y VALORACIÓN ECONÓMICA.

3.1.- Eliminación de materiales especificados de riesgo (MER)

Esta medida pretende la destrucción de los tejidos animales de mayor riesgo para evitar su paso a la cadena alimentaria humana y/o animal.

La medida es preceptiva desde el año 1996 para los animales nacidos en países con declaración de casos de enfermedades. Esta medida es obligatoria para la totalidad de animales, desde el 1 de octubre de 2000 y en ella se incluyen todos los MER, salvo los intestinos de bovino, cuya retirada es obligatoria desde el 1 de Enero de 2001.

Se consideran materiales especificados de riesgo (MER):

El cráneo, incluido el encéfalo, los ojos, las amígdalas, la médula espinal de los bovinos de más de doce meses de edad y el intestino, del duodeno al recto, de los bovinos de cualquier edad.

- El cráneo, incluido el encéfalo y los ojos, las amígdalas y la médula espinal de los ovinos y caprinos de más de doce meses de edad o en cuya encía haya hecho erupción un incisivo definitivo, así como el bazo de los ovinos y caprinos de todas las edades
- Los cadáveres de los bovinos, ovinos y caprinos de cualquier edad

Asimismo, todos los animales bovinos muertos en las explotaciones no sacrificados para el consumo humano tendrán la consideración de MER y deberán ser eliminados del mismo modo.

La retirada de MER ha supuesto unos costes adicionales para los Ayuntamientos de Castilla y León (en el caso de mataderos municipales), y para las propias industrias (en el caso de mataderos privados) además de los que ha supuesto para la Consejería de Agricultura y Ganadería que son abordados en el apartado siguiente. No obstante este apartado no se ha valorado teniendo en cuenta que la mayor parte de estos costes han sido soportados por los ganaderos a los que se han practicado descuentos.

3.2.- Eliminación de cadáveres en las explotaciones

Esta medida de eliminación de los cadáveres de las especies bovina, ovina y caprina persigue la destrucción total de los tejidos de mayor riesgo para evitar su traspaso a la cadena alimentaria humana y/o animal. En la práctica se realiza, igual que en el apartado anterior, recogiendo los animales en las explotaciones, sometiéndoles a un tratamiento previo en las industrias de transformación en subproductos para restarles humedad, volumen y riesgo sanitario y por último su eliminación mediante incineración o vertedero de residuos tóxicos.

Se lleva a cabo desde el 1 de Octubre de 2000 para los bovinos de más de 12 meses y ovinos y caprinos de cualquier edad, ampliándose desde el 1 de Enero de 2001 a todos los bovinos, ovinos y caprinos de cualquier edad y desde el 1 de Marzo de 2001 a todos los animales muertos en granja de cualquier especie.

En la actualidad las industrias de transformación de MER en la Comunidad de Castilla y León están ubicadas en las siguientes localidades: Cabrereros del Río en León (era la única existente cuando estalló la crisis a finales del año 2000), Valladolid y Ölvega (Soria), estando pendiente la conclusión de una nueva industria en San Martín y Mudrián (Segovia) estando prevista una nueva planta en la Provincia de Salamanca.

Las actuaciones realizadas por la Junta de Castilla y León, objeto de valoración, han sido las siguientes:

- Recogida de cadáveres de animales muertos en las explotaciones y transporte a las industrias de transformación en todas las provincias, excepto León cuya Diputación Provincial gestiona este servicio.
- Adjudicación del servicio de transformación de cadáveres de animales a dos industrias autorizadas para la transformación de MERs.
- Promulgación de una convocatoria de ayudas para la recogida, transporte y destrucción de cadáveres de animales en cada una de las provincias de la Comunidad , excepto León.
- Firma de Convenios de colaboración con las Diputaciones Provinciales con el objeto de financiar este servicio en las respectivas provincias. Las aportaciones comprometidas por las Diputaciones, excepto León, ascienden a 239,6 millones de pesetas para el año 2001.
- Iniciación de expediente para adjudicar a la empresa TRAGSA el servicio de retirada y transporte de cadáveres de animales rumiantes muertos en las explotaciones ganaderas en las provincias en las que la ejecución no hubiera sido adjudicada, a través del régimen de ayudas mencionado.
- Iniciación de expediente para la concesión de una subvención directa a la Diputación Provincial de León por importe de 105 millones de pesetas para financiar el servicio de retirada y destrucción de cadáveres de animales.

El coste de retirada de cadáveres y su tratamiento supone cantidades importantes, (en torno a 40.000 ptas. el ganado vacuno mayor, 20.000 los terneros y 6000 las ovejas y cabras). Estos costes han sido financiados en un 74 % aproximadamente por la Junta de Castilla y León, un 21 % por las Diputaciones Provinciales y un 5 % por los particulares (2.000 ptas. por vaca, 1.000 por ternero y 300 por oveja o cabra).

Este conjunto de acciones ha supuesto para la Junta de Castilla y León, a través de la Consejería de Agricultura y Ganadería, una inversión total comprometida de 1.132,8 millones de pesetas en el presente año. Una parte de la misma (un 33 %) ha sido aportada por la Administración General del Estado.

3.3.- Prohibición de harinas de carne y huesos en la alimentación de los animales

Se pretende con esta medida eludir cualquier riesgo de contaminación cruzada en piensos, evitando el consumo de harinas de carne y huesos por los animales rumiantes.

La Decisión 2000/766/CE (4 diciembre) prohibió el uso de proteínas animales en la alimentación animal de animales de granja, como medida de protección contra las EETs. Esta disposición fue incorporada en el decreto 3454/2000 y en los convenios de Colaboración entre la Administración del Estado y las Comunidades Autónomas. Se trata de una medida temporal por 6 meses que se prorrogará o levantará en función de la evolución de la enfermedad y de las inspecciones de verificación de la U.E.

El esquema de actuación se concreta en tres puntos:

Con el fin de que las fábricas puedan seguir transformando los despojos de mataderos, se hace necesario dar salida a las harinas acumuladas. Por eso se subvenciona la retirada del mercado, el transporte a vertedero o incineradora y destrucción de las harinas animales (financiación por el MAPA).

Adquisición y recogida durante 6 meses de las harinas de carne y hueso fabricadas (financiación al 50 % entre el MAPA y las Comunidades Autónomas).

Suscripción de un acuerdo con la Asociación de Empresas Fabricante de Cemento para la eliminación de las harinas animales (financiación por las Comunidades Autónomas).

La Junta de Castilla y León, a través de la Consejería de Agricultura y Ganadería, ha realizado las siguientes actuaciones en este punto:

a) Cuantificación del volumen de producción y las harinas almacenadas en las empresas de Castilla y León.

b) Toma de muestras y análisis de grasas en las empresas transformadoras, con el fin de comprobar posibles contaminaciones con impurezas proteicas animales.

c) Gestión del servicio de retirada de harinas de carne, hueso y sangre producidas en Castilla y León, lo que incluye la adquisición del producto, el transporte y su almacenamiento y otras acciones complementarias, como los análisis físicos y biológicos, o la gestión de pagos a las empresas productoras. Hasta la actualidad se han retirado 17.603,8 Tm de harina. Es destacable que Castilla y León ha sido la única Comunidad Autónoma que ha puesto en marcha este servicio, mientras que las demás limitaban su actuación al otorgamiento de ayudas

d) Contratación con fábricas de cemento la destrucción de las harinas de carne retiradas. Estas industrias han iniciado la adaptación de sus sistemas de fabricación para la incorporación de las harinas retiradas en el segundo semestre el año 2001.

e) Se ha iniciado la tramitación administrativa para la construcción de una planta incineradora de harinas de carne en la provincia de Zamora.

f) Control de emisiones en los procesos de destrucción de las harinas.

g) Gestión de los vertederos en los que se deposita el producto. En los cuatro vertederos autorizados en Castilla y León, se encuentran depositados 3,86 millones de Kg de subproductos obtenidos de transformación de los MER, de los cuales 2,07 millones de kg. son de harinas de carne y 1,79 de grasas.

El coste aproximado de retirada de harinas proteicas es de 32 ptas./kg por la adquisición, 4 ptas./kg por el transporte y un máximo de 6,75 ptas./kg por el almacenamiento.

Las inversiones realizadas por la Junta de Castilla y León, a través de la Consejería de Agricultura y Ganadería ascienden a 1.245 millones de pesetas, según sus propias estimaciones, para este apartado y hasta el momento actual.

3.4.- Control laboratorial

La medida pretende evitar, por una parte, que cualquier animal enfermo pase a la cadena alimentaria, garantizando la seguridad de los consumidores y también conocer el alcance real de la enfermedad en la cabaña ganadera.

Legalmente se establece el chequeo de todos los animales de riesgo mayores de 30 meses y una muestra de los animales muertos en las explotaciones, así como de todos los animales mayores de 30 meses que puedan ser liberados al consumo.

A nivel de la Administración del Estado se han potenciado las instalaciones y medios humanos tanto del Laboratorio Nacional de Referencia de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza, como del Laboratorio Central de Veterinaria del MAPA de Algete, con el fin de proceder a la confirmación de los diagnósticos realizados por los laboratorios de las Comunidades Autónomas. Asimismo se suministran los Test Prionics®, y se apoya la formación de personal.

Por parte de la Comunidad de Castilla y León, se designó el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León, como responsable del control analítico de la EEB mediante las pruebas rápidas (Prionics®); asimismo se designó el Laboratorio de la Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de León como responsable de la confirmación mediante técnicas de histopatología e inmunohistoquímica; el Laboratorio Agrario Regional (Burgos) fue encargado del control de residuos o productos animales en sustancias destinadas a la alimentación de animales de producción. Recientemente se ha designado al Laboratorio de Sanidad Animal de Aldearrubia (Salamanca), como Laboratorio autorizado para los análisis de la EEB, dependiendo del Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León. Asimismo se realizan las gestiones para la instalación de un nuevo laboratorio en Burgos.

Las actuaciones de Castilla y León se llevaron a cabo sobre los animales mayores de 30 meses para consumo humano, animales mayores de 20 meses procedentes de países de riesgo y sobre los animales sospechosos y muertos en las explotaciones.

Para la realización de estas acciones se han realizado las siguientes inversiones y/o actuaciones:

- Construcción de una unidad de diagnóstico en las instalaciones del Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León para realizar las pruebas rápidas (Test

Prionics®). Equipamiento con instrumentación analítica específica, mobiliario, etc.

- Construcción de la Unidad de Diagnóstico de Aldearrubia (Salamanca) para apoyar la actividad del Laboratorio de León en la realización de las pruebas. Equipamiento del mismo
- Dotación de personal. Han sido contratados para ambos laboratorios 6 técnicos, 4 Ayudantes de laboratorio, 6 Auxiliares y 3 Personal de Apoyo. Asimismo se han destinado 2 técnicos y 1 personal de apoyo de la plantilla anterior a estos nuevos laboratorios de diagnóstico de EETs.
- Adquisición de kits y reactivos para la ejecución de las pruebas analíticas.
- Adjudicación del servicio de gestión de residuos sanitarios Grupo III y IV de la Unidad de Diagnóstico del Laboratorio de León y la de Salamanca.

El día 15 de Enero, se iniciaron las pruebas analíticas en el Laboratorio Regional de Sanidad Animal de León, habiéndose realizado hasta el 30 de mayo el análisis de 16.299 muestras, de las cuales 14.585 corresponden a animales sacrificados con destino a la cadena alimentaria y 1705 corresponden a animales muertos en las explotaciones ganaderas o sacrificados con carácter obligatorio. El número de muestras diagnosticadas positivas asciende a 9 lo que supone un 0,055 % de las muestras procesadas.

Por otra parte la Facultad de veterinaria de León ha realizado el análisis anatomopatológico de 130 muestras, de las que 5 fueron para confirmación de los diagnósticos positivos realizados por el Laboratorio Regional.

Las inversiones realizadas en esta materia por la Junta de Castilla y León, y en particular por la Consejería de Agricultura y Ganadería, ascienden a 178,4 millones de pesetas.

3.5.- Control de animales susceptibles de estar afectados por EET y productos para la alimentación animal

El control de movimientos de animales de las especies bovina, ovina y caprina, así como el control de residuos MER hasta su total destrucción y el control de productos para la

alimentación humana han determinado una serie de actuaciones complementarias de la Junta de Castilla y León.

Por parte de la Consejería de Agricultura y Ganadería se han realizado las siguientes actuaciones:

- Establecimiento, desde Diciembre de 2000, de una red de alerta sanitaria cubierto por veterinarios oficiales, con objeto de atender situaciones de emergencia que se produzcan en las explotaciones.
- Contratación de un servicio telefónico gratuito de carácter informativo.
- Reidentificación de todos los animales bovinos identificados antes del 1 de Enero de 1998, mediante la sustitución de crotales y documentos de identificación.
- Identificación de los animales bovinos nacidos durante el año 2001.
- Identificación de los animales ovinos y caprinos.
- Grabación en la base de datos SIMOCYL de los nacimientos de bovinos en Castilla y León, así como todas las incidencias relativas a movimientos de animales y bajas.
- Control de entradas de MER en industrias de transformación autorizadas y salidas de subproductos obtenidos del proceso industrial. Esta actuación se ha reforzado mediante la contratación de 27 veterinarios y 7 controladores pecuarios.
- Control de productos elaborados para alimentación animal en las propias explotaciones o en industrias o almacenes intermediarios. Este control se ha realizado por la propia Consejería de Agricultura y Ganadería y por el Servicio de Protección a la Naturaleza (SEPRONA) de la Guardia Civil. Hasta el 30 de Mayo se han realizado 529 actuaciones por parte de la Consejería, inmovilizándose 1.186,17 Tm de productos y 357 actuaciones del SEPRONA con una inmovilización de 9,07 Tm. de productos.

El conjunto de actuaciones realizadas por la Consejería de Agricultura y Ganadería ascienden, según sus propias estimaciones a 531,3 millones de pesetas.

La Consejería de Sanidad y Bienestar Social ha realizado las siguientes actuaciones:

- Refuerzo del control oficial en mataderos que sacrifiquen animales bovinos mayores de 30 meses.
- Establecimiento de un sistema de control permanente todos los días de la semana realizado mediante guardias realizadas por los propios funcionarios veterinarios de la Consejería, mediante un sistema de compensación por pago de dichas guardias. Adquisición de vehículos para el desplazamiento de los funcionarios.

El conjunto de actuaciones de la Consejería de Sanidad y Bienestar Social ha sido valorado por nosotros en 100 millones de pesetas.

3.6.- Pago de indemnizaciones por animales sacrificados

Legalmente se establece el derecho a la percepción de una indemnización por el propietario de los animales sacrificados como consecuencia de sospecha o confirmación de las EETs. Como consecuencia se ha procedido al sacrificio de todos los animales en las explotaciones en las que se ha diagnosticado algún caso positivo. Se han realizado las siguientes actuaciones:

Hasta el 30 de Mayo de 2001 se han sacrificado 709 animales bovinos y 59 caprinos. Estos expedientes suponen el reconocimiento de derecho a la percepción de indemnizaciones por parte de los propietarios de 133.237.000 ptas. en concepto de valor de los animales sacrificados.

Para compensar el cese temporal de la actividad del titular de la explotación cuyos animales fueron sacrificados (lucro cesante) se ha establecido un régimen de ayudas destinadas a compensar los ingresos no percibidos, en función de la cuota de leche asignada y de su productividad media. Asimismo se ha establecido un sistema de compensación de animales de carne. Su pago se realiza una vez acreditada la explotación de nuevos efectivos que reemplazan a los animales sacrificados. Su estimación económica es de 34,6 millones de pesetas.

3.7.- Medidas de intervención de mercados

El objetivo de esta medida es amortiguar el impacto de la crisis sobre el sector productor. Se trata de medidas comunitarias adoptadas al amparo de la Organización Común del Mercado de vacuno.

Se pretende financiar dos medidas de intervención a través del FEOGA Garantía: la compra pública de carne con el fin de reducir excedentes de mercado y la compra para destrucción de animales de más de 30 meses. Además se prevén medidas en relación con la apertura de ayudas al almacenamiento privado, el aumento de las restituciones a la exportación y la elevación de los anticipos de las primas.

Compras públicas de carne de bovino. Hasta el 15 de Mayo de 2001, la Consejería de Agricultura y Ganadería ha gestionado la adquisición de 4.708.984 kg. de carne de vacuno por un importe de 1.957 millones de pesetas, a las que deben añadirse 149 millones de ptas. en concepto de almacenamiento en los centros frigoríficos.

Compra para destrucción de animales bovinos mayores de 30 meses. La Junta de Castilla y León ha gestionado la adquisición, entrega de animales, su sacrificio, la eliminación de las canales y de los subproductos y el pago a los interesados. Hasta el 15 de Mayo, se han adquirido y sacrificado 9.992 animales, habiéndose propuesto el pago de 6.511 de ellos que corresponden a 1533 solicitudes, por un importe de 644 millones de pesetas

3.8.- Actividades de investigación

La Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León realiza desde 1997, investigaciones correspondientes al programa de erradicación de la EEB, en cuya financiación colabora la Consejería de Agricultura y Ganadería. Esta actividad va a ser potenciada a través de un nuevo Convenio entre ambas partes que se firmará el presente mes de Junio con motivos de investigación.

Por el contrario, en ninguna de las cuatro últimas convocatorias del Programa Regional de Investigación de Castilla y León aparece ningún proyecto financiado referente a

la investigación de algún aspecto relacionado con la Encefalopatía Espongiforme Bovina. Por lo tanto el coste de esta actividad no ha sido valorado ya que se considera irrelevante.

A nivel de la Administración Central se ha puesto en marcha a través del Ministerio de Ciencia y Tecnología una Acción estratégica de investigación sobre las ETTs y seguridad alimentaria; en Febrero del año 2001 se ha realizado una convocatoria de ayudas para proyectos de investigación en el ámbito del Plan Nacional de I+D en el que se incluye esta acción estratégica aspira a dar respuesta científica a aspectos tan relevantes como la investigación clínica, epidemiológica y social sobre las ETTs en las especies humana y animal, la caracterización del agente etiológico y sus mecanismos de transmisión, el diagnóstico y la evaluación de riesgos. En el momento actual no podemos determinar, ya que la convocatoria no ha sido resuelta, su incidencia en el Territorio de Castilla y León.

3.9.- Otras medidas

Formación y capacitación del personal. La Consejería de Agricultura y Ganadería ha realizado diversas acciones formativas:

- Cursos para Veterinarios funcionarios de la Consejería de Agricultura y Ganadería sobre epidemiología, y en particular de la EEB, durante los años 1999 y 2000 en Valladolid, Burgos, Salamanca y León. Existe un nuevo curso programado para el presente año.
- Cursos de formación destinados al personal de los Laboratorios Provinciales de Sanidad Animal sobre el diagnóstico de la BSE.
- Cursos de formación a los veterinarios responsables de la toma de muestras en explotaciones y Centros de Transformación de Cadáveres.
- Cursos dirigidos a veterinarios de Cooperativas, Agrupaciones de Defensa Sanitaria de rumiantes, veterinarios de ejercicio libre de la profesión de actualización de conocimientos y aptitudes.
- Realización de sesiones informativas por parte del Laboratorio Regional de Sanidad Animal para veterinarios de Salud Pública sobre toma de muestras de EETs.

- Edición de folletos divulgativos relativos a la sintomatología de la EET, tanto para productores como para veterinarios.

Estimamos el coste de los Cursos realizados por la consejería de Agricultura y Ganadería en 8 millones de pesetas hasta el momento actual.

Por parte de la Consejería de Sanidad y Bienestar Social se han programado cursos de formación para veterinarios de Salud Pública, que se desarrollarán a partir del presente mes de Junio de 2001, por medio de los Colegios Profesionales de Veterinarios, que recibirán una financiación de 10.000 ptas. por alumno funcionario y a los que se permitirá el acceso sin financiación de otros veterinarios.

Campañas informativas. Con el fin de revitalizar el consumo de carne de vacuno, que experimentó una fuerte recesión a raíz de la aparición de los primeros casos positivos a la EEB, se han realizado campañas informativas y de promoción de carne de vacuno. En particular las actuaciones realizadas han sido las siguientes con un coste de 60 millones de pesetas:

- Fomento de acciones formativas a través de las Asociaciones de Consumidores, mediante subvenciones directas.
- Ejecución por la Consejería de Agricultura y Ganadería en colaboración con las de Industria, comercio y Turismo y Sanidad y Bienestar Social de campañas informativas directas
- Campaña de degustación de carne de vacuno
- Envío a los titulares de explotaciones de folletos divulgativos sobre la EET y sobre el servicio de alerta sanitaria
- Envío de cartas personalizadas y folletos a titulares de explotaciones de bovino, ovino y caprino, en relación con el servicio de retirada, transporte y destrucción de cadáveres.
- *Etiquetado de la carne de vacuno.* La Consejería de Agricultura y Ganadería ha en aplicación de los Reglamentos (CE) 1760/2000 del Consejo y 1825/2000 de la Comisión, ha desarrollado el etiquetado de la carne de vacuno y los controles a realizar en las explotaciones y establecimientos para verificar la

rastreabilidad del producto desde el nacimiento del animal hasta que la carne llegue al consumidor. Esta normativa ha derivado en la realización de actuaciones necesarias para garantizar la seguridad al consumidor de carne de vacuno.

- *Ayudas a las explotaciones extensivas.* Recientemente (Orden de 31 de Mayo) se ha establecido una ayuda a las vacas nodrizas cuyo montante económico ascenderá a los 2500 millones de pesetas.

3.10.- Sumario de la estimación de costes ocasionados por la crisis de la EEB en el Sector Público de Castilla y León:

El Cuadro siguiente expresa la estimación de los costes ocasionados por cada uno de los apartados en el Sector Público en Castilla y León:

Actuación	Millones de Ptas.
1. Eliminación de materiales especificados de riesgo (MER)	-
2. Eliminación de cadáveres en las explotaciones	1.133
3. Eliminación de harinas de carne y huesos de la alimentación de animales de producción	1.245
4. Control laboratorial	178
5. Control de animales susceptibles de estar afectados por EETs y productos de alimentación animal	631
6. Pago de indemnizaciones por animales sacrificados	168
7. Medidas de intervención de mercados	2.750
8. Actividades de investigación	-
9. Otras medidas	68
TOTAL	6.173

En el informe no se incluyen las inversiones futuras previstas, aunque hayan sido objeto de iniciación en su tramitación administrativa, algunas de las cuales se han descrito en el texto anterior.

**REPERCUSION ECONOMICA DE LA ENCEFALOPATIA
ESPONGIFORME BOVINA EN CASTILLA Y LEON**

D. Pablo Gordo Gómez

1 – Objetivos, metodología e hipótesis.

Desde la aparición del primer caso de Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en España (noviembre de 2000) se ha producido una reacción importante del consumidor, más sensibilizado que nunca en nuestro país ante cualquier tema relacionado con la sanidad alimentaria. Así, la aparición continua en los medios de comunicación de la enfermedad de las "vacas locas" y su expansión en varios países de la UE ha propiciado, durante los primeros meses del presente año, un clima generalizado de desconfianza, a veces indiscriminada, hacia el consumo de un buen número de productos cárnicos. La repercusión inmediata fue un descenso considerable en la demanda de estos productos, difícil de valorar por cuanto solamente han pasado unos meses desde la generalización del problema en nuestro país y aún no se tiene la certeza de haber entrado en el camino de solución definitiva del mismo.

Es sabido que una reducción importante en la demanda de consumo en uno o varios sectores productivos afecta también, directa e indirectamente, a un buen número de actividades relacionadas con ellos y, por tanto, al conjunto del sistema económico. Por esta razón, hemos tratado de valorar en este informe cuáles han sido los efectos directos e indirectos de la caída en la demanda registrada, concretamente en la producción cárnica y en las industrias transformadoras de este producto sobre el total del empleo y del valor añadido de la economía regional.

Para ello hemos utilizado la metodología InputOutput partiendo de los últimos datos publicados en las *"TABLAS INPT-OUTPUT Y CONTABILIDAD REGIONAL DE CASTILLA Y LEÓN"* correspondientes a 1995, donde se refleja el funcionamiento de la estructura productiva de la región, es decir las proporciones de factores (Inputs) que utilizan para la producción los 56 sectores productivos en los que se divide la economía regional y esto nos permite valorar cuantitativamente la parte de producción (Output), que cada uno de esos mismos sectores destinan a los demás y también a la demanda final para el consumo, tanto interior, como exterior.

Debemos aclarar, asimismo, que aunque estemos utilizando los datos de las tablas de 1995, (los últimos publicados) ello no quiere decir que estén alejados de la realidad, dado que, lo que realmente se maneja no son los valores absolutos que allí se indican, sino las proporciones de factores (Inputs) que utiliza el sector ganadero y la industria cárnica para producir, así como el destino de esa producción dirigido a otros sectores y al consumo final. De modo que lo que estamos empleando para nuestras estimaciones es un modelo que refleja la estructura productiva de los sectores afectados, con relación a todos los demás, y esto no es una circunstancia que, en economía, varíe sustancialmente a corto plazo.

Las hipótesis de las que hemos partido para realizar nuestras estimaciones con el modelo indicado son las siguientes:

- 1 - El sector bovino y transformaciones cárnicas de la misma especie representan una cuarta parte de la producción ganadera y de la industria cárnica regional.
- 2 - Paralización absoluta de las ventas de carne de bovino dirigidas a la exportación, desde la aparición del primer caso EEB en España.
- 3 - El descenso producido en la demanda final para el sector ganadero bovino y las industrias transformadoras se valora, de acuerdo con los siguientes escenarios:

Previsión (31-12-2001)	Reducción del consumo
A	10 %
B	20 %
C	30%
D	40 %

2 - Resultados del impacto EEB sobre el conjunto de la economía regional.

2.1 - EFECTOS SOBRE LA PRODUCCION

Desde las hipótesis expuestas y con el modelo de previsión que se ha indicado, el impacto global en el valor añadido bruto regional de la EEB se estima que puede

descender, en el caso de la hipótesis mas pesimista, hasta un 0,3% del total, proporción que viene a significar, en términos absolutos, unos 16.500 millones pts, en el supuesto de un descenso de un 40% en la demanda interior al final del período considerado. El sector ganadero sería el más afectado con una pérdida de valor añadido, bajo esa misma hipótesis, próxima a los 8000 millones de pts; si bien, en términos relativos, es la industria cárnica regional la más afectada por esta crisis, dado que, la reducción de ventas de bovino en un 40% se puede traducir en un descenso de valor añadido para toda la transformación cárnica (salarios y beneficios) próximo al 7%.

Sin embargo, la hipótesis más plausible, desde que apareció el problema hasta el mismo momento de cerrar este informe (septiembre de 2001), es que el descenso de la demanda interior apenas sobrepase el 10% desde el comienzo de la crisis EEB hasta finales de 2001. En este caso, solamente afectaría al 0,07% del VAB regional, lo cual viene a significar unos 4000 millones pts, la mitad de los cuales corresponden al sector agrario, en tanto que la industria cárnica solamente vería reducida en 835 millones de pts, es decir un 1,7% su VAB con motivo de un descenso de un 10% en las ventas de bovino. La TABLA 1 y el GRAFICO 1 ilustran con mas detalle estas apreciaciones para los 4 supuestos considerados.

GRAFICO 1

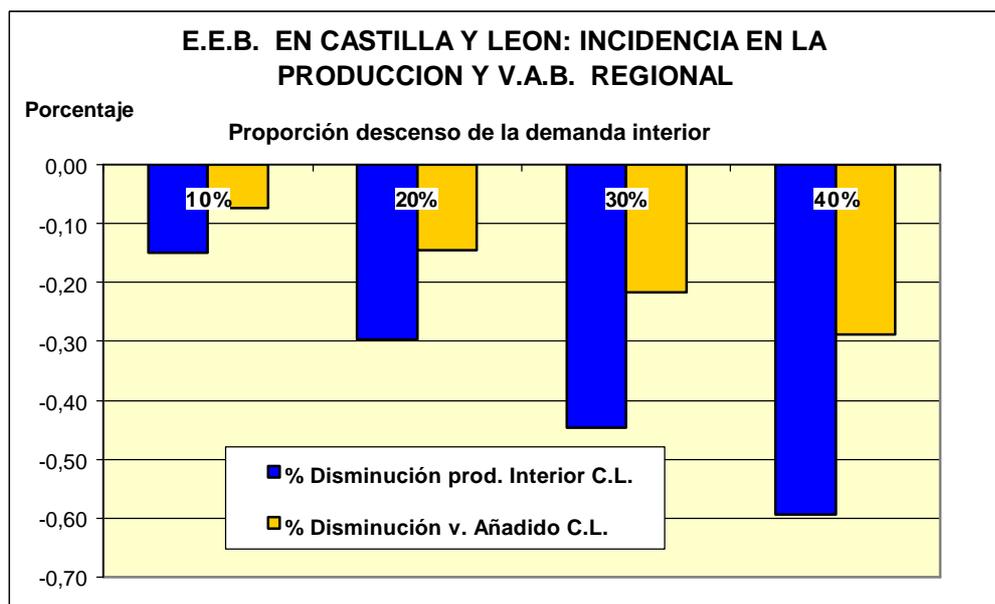
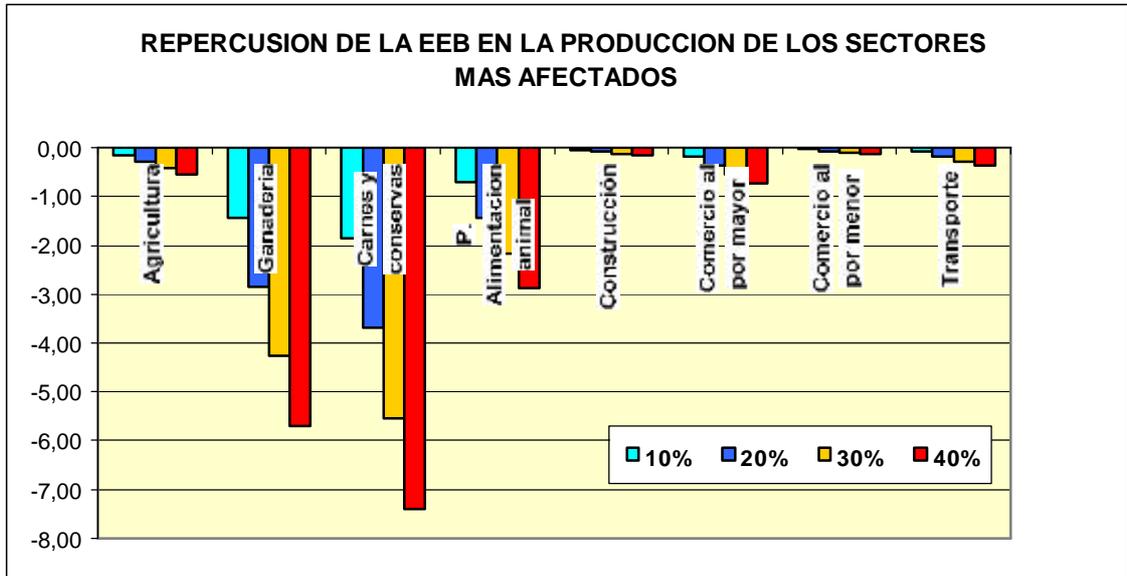


TABLA 1

Estimaciones 2001 del impacto EEB sobre el V.A.B. de Castilla y León									
	VAB (CF) mill pts.	1 - VAB - Reducc. demanda 10%	2 - VAB - Reducc. demanda 20%	3 - VAB - Reducc. demanda 30%	4 - VAB - Reducc. demanda 40%	1 - Var Absoluta VAB	2 - Var Absoluta VAB	3 - Var Absoluta VAB	4 - Var Absoluta VAB
Total CL	5.675.338	5.671.365	5.667.392	5.662.852	5.654.918	-3.973	-7.945	-12.486	-16.447
S. Agrario	407.413	405.295	403.388	401.269	397.286	-2.119	-4.025	-6.144	-8.009
Ind cárnica	48.845	48.010	47.179	46.344	44.736	-835	-1.666	-2.501	-3.274

En cuanto a las actividades económicas más afectadas en la producción por este descenso en la demanda de carne de bovino, son las de industrias, cárnicas, ganadería y productos de alimentación animal los que más sufren el impacto derivado de la crisis EEB. (GRAFICO 2)

GRAFICO 2



2.2 - EFECTOS SOBRE EL EMPLEO REGIONAL:

Según indican los resultados de nuestro análisis (TABLA 2) las previsiones más realistas hasta el momento, en cuanto a la reducción de la demanda de carne para este año, cifran en cerca de 1000 la pérdida de empleos, de un total de 872.100 existentes para Castilla y León, debido a la incidencia de la EEB. Asimismo, hay que indicar que no se trata de una pérdida de empleos consolidada sino que, por efecto de la EEB, ese número de puestos de trabajo es susceptible de despido. Evidentemente, no se tiene constancia definitiva de que las explotaciones ganaderas y las industrias cárnicas hayan despedido ya esos 1000 empleos pero la reducción de sus excedentes brutos de explotación pueden dar lugar a que esas personas pierdan sus empleos.

TABLA 2

PREVISION DE REDUCCION EN LA DEMANDA CARNICA	Empleos directos	Empleo total
10%	-466	-987
20%	-933	-1.974
30%	-1.399	-2.961
40%	-1.865	-3.948

Las actividades económicas más afectadas por esta pérdida de empleos (TABLA 3 y GRAFICO 3) son el ganadero, la industria cárnica, la agricultura y la distribución comercial del producto (minorista y mayorista) y piensos compuestos, en conjunto alcanzan el 85% de los empleos que pueden verse afectados por la reducción de demanda de consumo prevista según nuestras hipótesis.

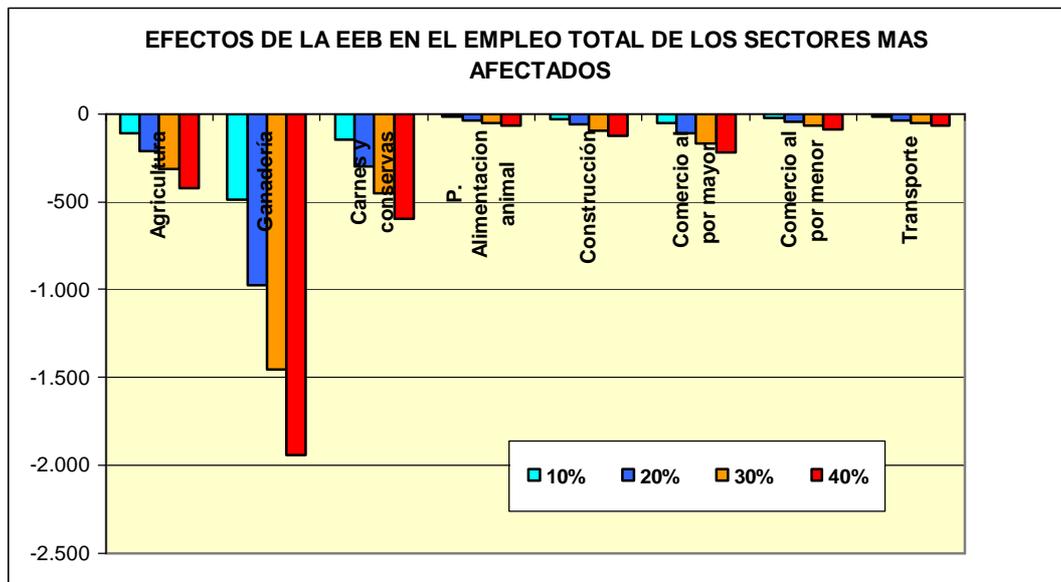
TABLA 3

DESCENSO EN EL EMPLEO TOTAL EN LOS SECTORES MAS AFECTADOS POR LA EEB EN CASTILLA Y LEON				
	10%	20%	30%	40%
Agricultura (1)	-105	-211	-316	-421
Ganadería	-486	-972	-1.457	-1.943
Carnes y conservas (2)	-150	-299	-449	-598
P. Alimentación animal	-17	-33	-50	-67
Construcción	-30	-61	-91	-122
Comercio al por mayor	-55	-110	-165	-220
Comercio al por menor	-22	-45	-67	-89
Transporte	-17	-33	-50	-67
RESTO SECTORES	-105	-210	-316	-421
TOTAL	-987	-1.974	-2.961	-3.948

(1) Empleos estimados para 2001 en el total del sector agrario = 87.167

(2) Empleos estimados para 2001 en la industria cárnica = 7.862

GRAFICO

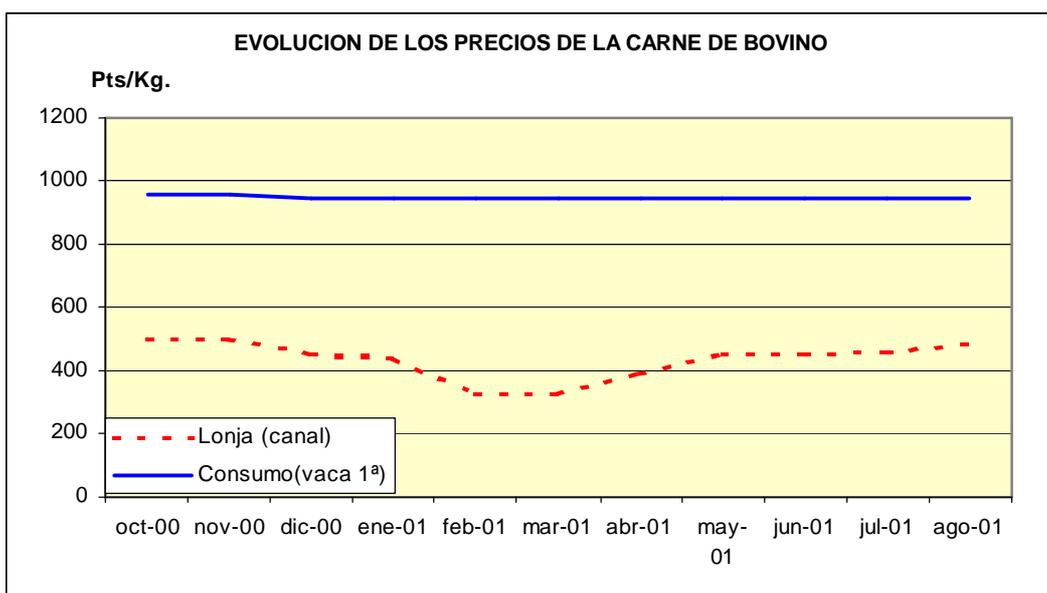


3

3 - Disminución de los ingresos para el sector productivo ganadero.

Además de los efectos económicos globales de la EEB estimados para la economía regional, descritos en el apartado anterior, hemos querido realizar también en este informe una primera estimación de la disminución de ingresos en explotación que puede suponer para el sector ganadero el problema de las "vacas locas", nuestra apreciación está fundamentada en el hecho de que ha sido precisamente este sector quien mayor impacto económico ha sufrido hasta ahora por esta crisis. Así lo demuestra la evolución de los precios pagados al ganadero en lonja por la carne de bovino, que han llegado a descender hasta un 35% durante los meses de febrero y marzo para recuperarse posteriormente durante el mes de agosto del presente año, en tanto que apenas se ha registrado variación alguna en los precios al consumidor para las distintas clases de carne de vacuno (GRAFICO 4)

GRAFICO 4



La estimación de disminución de ingresos para el ganadero se ha realizado para el período comprendido desde noviembre del año 2000 hasta diciembre del presente año 2001 (14 meses) y se ha valorado en función de los ingresos que hubiera tenido el ganadero durante el mismo plazo, en caso de que no hubiera afectado al mercado el problema de la EEB. Para ello, se han calculado los ingresos

obtenidos por ventas para sacrificio durante el período considerado¹ cuando solamente se dispone de datos fiables para los dos primeros meses del citado período; de modo que hemos tenido que realizar una estimación de los sacrificios previstos hasta diciembre de 2001, basándonos en los datos de evolución de los mercados hasta el mes de agosto y bajo el supuesto, cada vez más realista de una recuperación de las ventas, hasta los mismos niveles del año anterior, a partir de octubre de 2001.

Los resultados se recogen en la TABLA 4 y cifran en un 28,5 % el primer impacto para el ganadero en términos de menores ingresos directos de explotación, por caída de precios y de ventas, causa principal del problema económico para el ganadero. No obstante, a partir de los datos suministrados por la Dirección General de Producción Agropecuaria de la Junta de Castilla y León, se han tenido en cuenta las subvenciones que el conjunto del sector ganadero puede llegar a percibir como consecuencia de esta crisis hasta finales del 2001. Dichas subvenciones figuran también en la TABLA 4 y se refieren a la indemnización por sacrificio de animales afectados por detección de la EEB (709 casos), incluida la compensación por "lucro cesante", así como a las compras públicas por excedentes en producción y por destrucción de animales de más de 30 meses; además, ha sido incluida en estos cálculos la ayuda excepcional que pueden percibir los ganaderos este año 2001 por vaca nodriza (Orden 30-5-2001), con motivo de las medidas excepcionales tomadas por la EEB.

¹ No se trata de calcular en este caso el beneficio ó pérdida obtenido por el sector ganadero, por ello, salvo la prima de sacrificio, no se incluyen las subvenciones ordinarias que éste recibe y que para el año 2000 están estimadas en un total de 26.100 millones de pts.

TABLA 4

ESTIMACION DE LA DISMINUCION DE INGRESOS PARA EL PRODUCTOR DE BOVINO DE CARNE EN CASTILLA Y LEON DESDE LA APARICION DE LA CRISIS POR LA EEB

(Supuesta una recuperación total de las ventas, respecto al año anterior, a partir de Noviembre 2001)

Millones pts. - Período: Noviembre 2000 - Diciembre 2001 (14 meses)

DESTINO DEL GANADO	Reses	Valor mercado	Subvenciones	I. Ganadero
1 - SIN INCIDENCIA EEB				
VENTA PARA SACRIFICIO (incl. prima)	582.859	73.727	3.157	76.884
2 - DESPUES INCIDENCIA EEB				
VENTA ORDINARIA MERCADO (incl. prima sacrificio)	478.629	51.911	2.593	54.504
INDEMNIZACION SACRIFICIO + "Lucro Cesante"	709		168	168
COMPRAS PUBLICAS POR EXCEDENTES	18.540		1.957	1.957
COMPRAS PARA "Destrucción" (+30 meses)	9.942		989	989
Ayuda excepcional vaca nodriza (Orden 30-5-01)			2.500	2.500
INCREMENTO DE COSTES PARA EL GANADERO				
Retrasos en venta (stock ganadero)		-1.351		
Separación MER y Certificados		-3.829		
TOTAL 2001 DESPUES INCIDENCIA EEB	507.820	46.731	8.207	54.938
VARIACION (1-2) POR EEB (C-L.)	-75.039	-26.996	5.049	-21.946
% Variación	-12,9	-36,6	159,9	-28,5

Valores medios estimados

Peso medio canal (Kgs)	254
Precio/canal antes EEB (Pts/Kg.) (enero/nov. año 2000)	498
Precio medio/canal EEB (Pts/Kg.) (nov/00/agosto/01)	427
Prima ordinaria media por sacrificio (pts. cabeza)	5.417
Retrasos en venta (60 días por res) coste/día:	300
Coste medio separacion MER y certificados/res	8000

El coste de eliminación de cadáveres no figura en el cálculo puesto que resulta muy poco significativo para el ganadero; hasta ahora dicho coste ha afectado a 709 casos y el ganadero solamente tiene que pagar 2000 pts. por vaca y 1000 por ternera, dado que es la Administración la que corre con la mayor parte de los gastos (a pesar de que, por ley no esta obligada a ello). En cambio sí hemos tenido en cuenta el coste que supone para el ganadero los certificados sanitarios y la separación en matadero de elementos de riesgo, así como el de mantenimiento de las reses por los retrasos en las ventas ante las incertidumbres del mercado.

El resultado final para el ganadero después de todo este proceso es una disminución de ingresos por la venta de ganado próxima a los 22.000 millones de pts. un 28% de los ingresos ordinarios que tenía de no haber existido el problema de la EEB.

Por el momento estas son las previsiones realizadas sobre los efectos económicos de la EEB en el sector privado Castilla y León, referidas tanto al conjunto

de la economía regional, como al primer impacto sobre los ingresos para el ganadero. Los resultados tendrían que ser revisados inmediatamente si antes de finalizar el presente año se incrementa sustancialmente el número de casos de EEB aparecidos en España.