



Tomás Mañoral

Laboratorio Central de Veterinaria. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente

POENCIA

'Nuevas perspectivas sobre el scrapie: evolución y estado actual'

INTRODUCCIÓN

La tembladera (Scrapie) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva y fatal presente de modo natural en ovinos, caprinos y muflones, que se describió por primera vez en Reino Unido hacia el año 1730 (Comber 1772). Forma parte de un grupo de patologías denominadas encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), que afectan tanto a animales como a humanos, causadas por priones. Estas, se caracterizan por la transformación de una proteína del hospedador (PrP^c) en una isoforma con un plegamiento anómalo (PrP^{Sc}) que se acumula y se puede detectar principalmente en tejidos del sistema nervioso central.

Es a partir de la década de los años 80, cuando debido a la aparición de la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB), las EET son sometidas a un mayor control. Si bien, en el caso de la tembladera se ha considerado que no se transmite a humanos, la bibliografía científica si establece una relación entre la EEB y la aparición de una variante de la EET en humanos denominada enfermedad Creutzfeldt-Jakob (Bruce, et al. 1997; Hill, et al. 1997).

Actualmente en ovino y caprino, se conoce que existen dos variantes de la enfermedad: El Scrapie clásico, haciendo referencia a la enfermedad conocida de modo general como tembladera, pero también una nueva cepa denominada Scrapie atípico. Esta, fue descrita por primera vez en el año 1998 en Noruega (Benestad, 2003) por lo que en un principio también se la conoció como Nor98. **(Ver Tabla 1)**

El Scrapie clásico ha sido descrito al menos en 17 Estados Miembros de la UE y la prevalencia actual es de 8,7 casos cada 10.000 pruebas de análisis. En el caso del atípico, se ha declarado en 21 países de la UE y la prevalencia es de 5,8 casos cada 10.000 pruebas de análisis.

De acuerdo a los datos de la Unión Europea, la edad media de los animales enfermos detectados también varía, siendo de aproximadamente 4 años en Scrapie Clásico y de 6,5 años para Scrapie atípico.

DIAGNÓSTICO DE SCRAPIE

Para el análisis no existen métodos serológicos como en otras enfermedades y debido a la naturaleza del agente y su origen a partir de la transformación de una proteína presente en el organismo, el diagnóstico validado hasta la fecha es siempre post mortem.

Los métodos reconocidos son:

- Métodos para la detección de fibrillas asociadas a Scrapie (SAF) por microscopía electrónica.
- Métodos histopatológicos que se basan en la detección de la proteína 'patógena' por inmunohistoquímica y observación de lesiones.
- Métodos moleculares, como ELISA o inmunotransferencia que permiten conocer propiedades asociadas a la PrP^{Sc} causante de la enfermedad.

Asimismo los tipos de análisis se diferencian en:

- Análisis realizado por tests rápidos (para cribado).
- Análisis de confirmación de la enfermedad.
- Análisis de discriminación de cepas (Scrapie clásico / Scrapie atípico).

Además está el análisis del gen prnp que se realiza tanto para el programa de selección de resistencia a EET en ovino, para todos los casos positivos a Scrapie en esta especie, como el muestreo de genotipado aleatorio realizado de acuerdo a las indicaciones de la Unión Europea (UE).

La realización de los ensayos se lleva a cabo por una red laboratorial que incluye laboratorios autorizados de las Comunidades Autónomas, un Laboratorio Nacional de Referencia (LNR) que es el Laboratorio Central de Veterinaria y a nivel europeo, un Laboratorio de Referencia de la UE (Animal and Plant Health Agency- Reino Unido), que coordina el diagnóstico y colabora con los LNR de cada Estado Miembro.

Todos los laboratorios que participan en el diagnóstico de EET, se someten a controles de calidad en sus actividades diarias. Estos incluyen la acreditación de acuerdo a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 que garantiza la competencia de los laboratorios de ensayo; Pero también la participación en ensayos interlaboratoriales de aptitud anuales, los cuales sirven para constatar la capacidad técnica de los participantes.

El control y erradicación de la tembladera, se engloba dentro del Programa Integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiiformes transmisibles de los animales, regulado por el Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre.

Desde el inicio de los programas de control y erradicación de EET, para el caso concreto de la tembladera se han analizado más de 789.000 animales, de ovino y caprino, y se han declarado 435 focos de Scrapie para ambas especies.

Si se observa la repartición de focos según el tipo de EET en ovino, durante este tiempo, se ha observado un incrementado





el número de casos de Scrapie atípico en ovino en relación con los de Scrapie clásico. (Ver Figura 1)

Asimismo, en todos los casos positivos a los métodos de análisis, también se ha descartado la presencia de EEB en ovino/caprino, no habiéndose detectado en España ningún caso de esta enfermedad.

PROGRAMA NACIONAL DE SELECCIÓN GENÉTICA PARA LA RESISTENCIA A LAS ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN OVINO

En los últimos años, a petición de la Comisión de la Unión Europea, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha publicado numerosos dictámenes científicos en que se avala el hecho de que los programas de selección de ovinos resistentes a las EETs son una herramienta de gran utilidad para mejorar el estatus sanitario de la cabaña ovina, recomendando por ello el uso de ovinos resistentes para la reproducción.

Las bases de los programas están en las evidencias científicas que demuestran que las mutaciones que se pueden encontrar en los codones 136, 154 y 171 del gen que codifica para la proteína del prion otorgan diferentes grados de resistencia/susceptibilidad a la enfermedad.

En concreto las mutaciones Valina (V) 136, Arginina (R) 154 y Glutamina (Q) 171 presentes en el gen *prnp*, confieren mayor susceptibilidad al Scrapie mientras que las mutaciones Alanina (A) 136, Arginina (R) 154 y Arginina (R) 171 otorgan resistencia a la enfermedad. Esta combinación de polimorfismos hace que llamemos a los alelos presentes en el gen con tres letras, siendo cada una de ellas identificativa de estas tres posiciones, como es VRQ (V₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁).

Pueden observarse hasta 7 diferentes (VRQ, ARQ, ARH, AHQ, ARR, ALQ y ARK) que dependiendo de su presencia en homocigosis o heterocigosis en el ADN permiten encontrar en la naturaleza 27 genotipos diferentes en los animales. Estos genotipos pueden clasificarse en base su relación con la presencia de la tembladera de menor a mayor resistencia / mayor a menor susceptibilidad. (Ver Figura 2)

La Decisión 2003/100/CE, de la Comisión, de 13 de febrero de 2003, por la que se fijan los requisitos mínimos para el establecimiento de programas de cría de ovinos resistentes a las encefalopatías espongiformes transmisibles, determinaba la obligatoriedad para los Estados Miembros de poner en marcha programas de cría de ovinos resistentes a las encefalopatías espongiformes, así como los requisitos mínimos que debían cumplir.

En España estos requisitos se recogen en el Real Decreto 1312/2005 de 4 de noviembre, por el que se establece el Programa nacional de selección genética para la resistencia a las encefalopatías espongiformes transmisibles en ovino, y la normativa básica de las subvenciones para su desarrollo.

Los principales contenidos de esta norma recogían:

- El establecimiento de programas de selección genética para cada raza ovina.

Figura 1. Evolución focos scrapie en ovino.

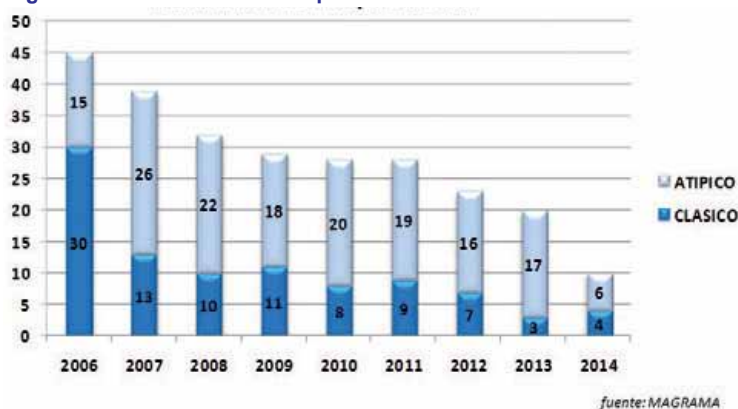


Figura 2. Mayor o menor resistencia / susceptibilidad a la tembladera de las diferentes combinaciones de alelos presentes en el ADN del ovino.

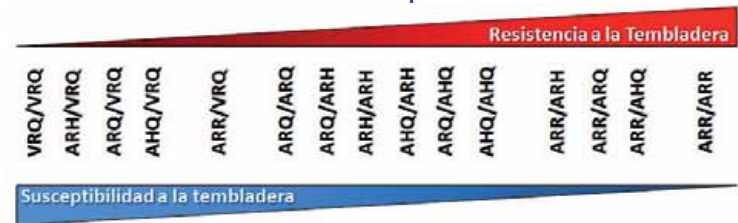


Tabla 1. Principales diferencias entre cepas de scrapie clásico y scrapie atípico.

Principales diferencias entre cepas	
Scrapie clásico	Scrapie atípico
Incidencia no uniforme en Europa	Incidencia uniforme en Europa
Periodo incubación 2-7 años	Principalmente en animales de edad avanzada
Transmisión vertical y horizontal conocida.	Transmisión experimental demostrada. Posibilidad de transmisión natural en estudio
Presencia de PrP ^{Sc} resistente a Proteínasa K	Presencia de PrP ^{Sc} más sensible a la proteínaasa K
Dependiente de polimorfismos en codones 136, 154 y 171 del gen <i>prnp</i>	Dependiente también de polimorfismos en codón 141 del gen <i>prnp</i>

- La identificación individual de los animales participantes en el programa, toma de muestras, análisis y certificación de su genotipo para el gen *PRNP*.

- El desarrollo y explotación de un sistema nacional de información, para la identificación y genotipado de ganado ovino, denominado ARIES.

- La clasificación y el reconocimiento oficial del estatus de resistente a las EET de ciertas explotaciones de ovinos, en función del genotipo de sus reproductores.

- La designación de un laboratorio nacional de referencia para el genotipado de ovino y el establecimiento del procedimiento de designación de otros laboratorios autorizados.

Posteriormente el Reglamento (CE) nº 727/2007, de la Comisión, de 26 de junio, por el que se modifican diferentes anexos del Reglamento (CE) nº 999/2001, del Parlamento Europeo y del Consejo, introdujo requisitos mínimos armonizados para dichos programas de cría y derogó la Decisión 2003/100/CE, de la Comisión, por lo que el programa actualmente queda a criterio de los Estados miembros continuar con la aplicación de los programas mencionados.

Estas modificaciones están incluidas en el Real Decreto



21/2013, de 18 de enero, por el que se establece el programa nacional de selección genética para la resistencia a las encefalopatías espongiformes transmisibles en ovino. Aunque en líneas generales muchos aspectos del anterior Real Decreto se mantienen vigentes, se introducen como novedades o consolidación de otros puntos, los siguientes:

- La ejecución de programas de selección genética para aquellas razas ovinas en las que la resistencia a las EETs sea un objetivo de sus programas de mejora.

- La certificación y clasificación de los machos reproductores en función de su genotipo.

- El mantenimiento y actualización de la Base de Datos ARIES que contiene información sobre la identificación individual y raza de cada animal muestreado en el programa de selección, así como los resultados de cualquier prueba de genotipado realizada.

El control de muestras para el programa se realiza por medio de ARIES, que actúa como un intermediario entre los remitentes y el laboratorio. Los tubos de muestras se correlacionan en origen con la identificación del animal, se graban en ARIES y se envían al laboratorio. **(Ver Figura 3)**

Los análisis que se realizan en el LCV entran en un proceso robotizado que asegura la trazabilidad, mediante un control informatizado de identificadores de tubos asociados a animales para cada proceso, sin necesidad de intervención del personal del centro, lo que asegura la ausencia de errores en la interpretación de los códigos de barras.

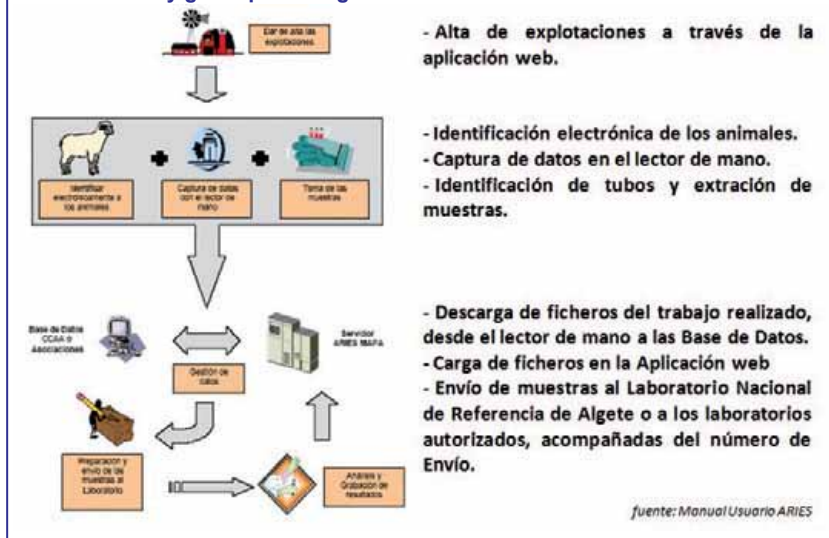
Una vez obtenidos los genotipos, el laboratorio introduce los resultados asignados a cada animal que pasan a estar disponibles en tiempo real para los usuarios, que pueden acceder a la información a través de claves personales que controlan el acceso a la información.

Desde el inicio del programa de selección, se han analizado más de 3.500.000 animales pertenecientes a 52 razas de ovino. Durante ese tiempo, la colaboración entre las asociaciones de ganado selecto y el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, ha permitido mantener un muy alto nivel de productividad, detectándose incidencias únicamente en el 1,87% de las muestras.

Un análisis del efecto del programa de selección sobre los nacimientos de animales, permite observar que desde el año 2003 al año 2014, el alelo ARQ (con un grado de susceptibilidad medio al Scrapie) ha pasado de suponer un 60,33% del total a un 37,61%. De forma paralela, el alelo ARR (alelo con mayor nivel de resistencia) se ha incrementado del 28,42% a representar el 57,23% de alelos, y el VRQ, con mayor susceptibilidad a la enfermedad, representa en 2014 el 0,40%.

Si se analiza estos datos en función de los genotipos de animales nacidos, el genotipo ARQ/ARQ que en 2003 estaba presente en el 40,20% de nacimientos, supone el 22,91% de animales en el año 2014. Por el contrario, el genotipo que confiere mayor resistencia a la enfermedad ARR/ARR, aumenta su incidencia del 9,92% al 36,03%. Estos datos junto con el de animales ARR/ARQ en el último año, implican que más del

Figura 3. Esquema de trabajo del sistema nacional de información, para la identificación y genotipado de ganado ovino denominado ARIES.



67% de la población de ovino nacida en 2014 es altamente resistente a la tembladera. **(Ver Figura 4)**

Por otro lado, los genotipos asociados a los casos de Scrapie detectados en España, se distribuyen del modo esperado para ambas variantes. En Scrapie clásico, se puede observar que aproximadamente el 92% de casos poseían el genotipo ARQ/ARQ y el polimorfismo Leucina en la posición 141. En Scrapie atípico, aunque el genotipo con mayor presencia es el ARQ/ARQ (34%) también aparecen de forma significativa el ARQ/AHQ y el ARR/ARQ que suponen el 47% del total. La Fenilalanina 141 asociada en diversos estudios científicos con la cepa atípica, aparece en algo más del 25% de casos, siendo el resto de animales Leucina 141.

El estudio de otros polimorfismos en casos de Scrapie en España, ha permitido detectar hasta 13 mutaciones silentes (aquellas cuya variación en el codón, no producen cambio de aminoácido para el que codifica) y 43 polimorfismos de sustitución que producen cambios en la secuencia primaria de la proteína PrP^C. En ningún caso, las mutaciones presentes influyen en la resistencia/susceptibilidad a la enfermedad que alteren el objetivo del programa de selección.

Durante el desarrollo del programa de genotipado, se ha podido conocer además la distribución de nuevos alelos surgidos del análisis, como son el ALQ (Leucina 154) y ARK (Lisina 171), aunque ambos casos suponen un porcentaje pequeño de la población analizada. Estudios en curso, parecen indicar que la susceptibilidad a la enfermedad de los animales con algunos de estos dos alelos es similar a la del ARQ.

El alelo ALQ aparece en 20 razas diferentes, siendo tres de ellas las que integran el 80% de los animales. Por su lado, el alelo ARK, está presente en 28 razas diferentes, aunque como con el caso del ALQ, son cinco razas las que cuentan con el 90% de individuos con el polimorfismo Lisina 171.

BIBLIOGRAFÍA

Arsac, J.N., O. Andreoletti, J.M. Bilheude, C. Lacroux, S.L. Benestad, and T. Baron. 2007. Similar biochemical signatures and prion protein genotypes in atypical scrapie and Nor98 cases, France and Norway. *Emerg. Infect. Dis.* 13:58-65.

Baker, H.F., R.M. Ridley, and G.A. Wells. 1993. Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet. Rec.* 132:403-406.

Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schönheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of



scrapie with Unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003 Aug 16; 153(7):202-8.

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

Colussi, S., G. Vaccari, C. Maurella, C. Bona, R. Lorenzetti, P. Troiano, F. CasaLinuovo et al. 2008. Histidine at codon 154 of the prion protein gene is a risk factor for Nor98 scrapie in goats. *J. Gen. Virol.* 89:3173-3176.

Comber T (1772) *Real Improvements in Agriculture*, First edition edn. W. Nicoll, London

Detwiler, L.A. 1992. Scrapie. *Rev. Sci. Tech.* 11:491-537.

Elsen, J.M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eycheenne et al. 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: Detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch. Virol.* 144:431-445.

Griffiths, P.C., J. Spiropoulos, R. Lockey, A.C. Tout, D. Jayasena, J.M. Plater, A.Chave et al. 2010. Characterisation of atypical scrapie cases from Great Britain in transgenic ovine PrP mice. *J. Gen. Virol.* 91(8):2132-2138.

Groschup, M.H., C. Lacroix, A. Buschmann, G. Lühken, J. Mathey, M. Eiden, S. Lugan et al. 2007. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg. Infect. Dis.* 13:1201-1207.

Hill A.F., Desbruslais M., Joiner S., Sidle K.C., Gowland I., Collinge J., Doye L.J., Lantos P., The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* (1997) 389:448-450. 526.

Hunter, N., J. D. Foster, W. Goldmann, M. J. Stear, J. Hope, and C. Bostock. 1996. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch. Virol.* 141:809-824.

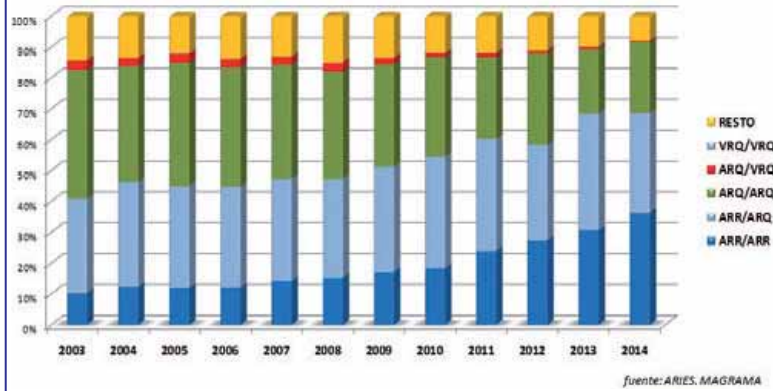
Kittelberger, R., M.J. Chaplin, M.M. Simmons, A. Ramirez-Villaescusa, L. McIntyre, S.C. MacDiarmid, M.J. Hannah et al. 2010. Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:863-875.

Le Dur, A., V. Béringue, O. Andréoletti, F. Reine, T.L. Lai, T. Baron et al. 2005. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:16031-16036.

McIntyre, K.M., V.J. del Rio Vilas, and S. Gubbins. 2008. No temporal trends in the prevalence of atypical scrapie in British sheep, 2002-2006. *BMC Vet. Res.* 4:13.

Moreno, C.R., K. Moazami-Goudarzi, P. Laurent, G. Cazeau, O. Andreoletti, S.Chadi, J.M. Elsen, and D. Calavas. 2007. Which PrP haplotypes in a French

Figura 4. Evolución de la presencia de las diferentes combinaciones de alelos en las muestras gestionadas por el programa ARIES, que indica que el número de animales resistentes crece de forma importante.



sheep population are the most susceptible to atypical scrapie? *Arch. Virol.* 152:1229-1232

Moum, T., I. Olsaker, P. Hopp, T. Moldal, M. Valheim, T. Moum, and S.L. Benestad. 2005. Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol.* 86:231-235.

Simmons, M.M., T. Konold, H.A. Simmons, Y.I. Spencer, R. Lockey, J. Spiropoulos, S. Everitt, and D. Clifford. 2007. Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Vet. Res.* 3:20.

Simmons, M.M., T. Konold, L. Thurston, S.J. Bellworthy, M.J. Chaplin, and S.J. Moore. 2010. The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet. Res.* 6:14.

Thorgeirsdottir, S., S. Sigurdarson, H.M. Thorisson, G. Georgsson, and A. Palsdottir. 1999. PrP gene polymorphism and natural scrapie in Icelandic sheep. *J. Gen. Virol.* 80:2527-2534.

Vaccari, G., M.A. Di Bari, L. Morelli, R. Nonno, B. Chiappini, G. Antonucci, S. Marcon et al. 2006. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie. *J. Gen. Virol.* 87:1395-1402.

van Keulen, L.J., B.E. Schreuder, M.E. Vromans, J.P. Langeveld, and M.A. Smits. 2000. Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch. Virol. Suppl.* 16:57-71.





Instalaciones de ordeño // Gestión de rebaños
Refrigeración // Higiene y calidad de leche
Separación de purines



Raspa, barre y encama





Comercial Lobo / servicio 24 horas

Ctra. Madrid-Irún, Km 153 - 09471 Fuentespina (Burgos)
 Tfno: 947 50 18 79 / Tfno. móv: 608 48 05 37 / Fax: 947 51 27 47 / Mail: rosi@comerciallobo.es