

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



**Estudio de la dinámica del tejido linfoide en mucosas de pequeños
rumiantes para su aplicación en el diagnóstico de Scrapie**

Trabajo de Tesis para optar por el título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Autor: Vet. Mauro Julián Gallardo

Director: Dr. Fernando Delgado

Codirector: Dr. Pablo Chacana

Buenos Aires, 2023

Agradecimientos

Agradezco a toda la gente que colaboró con este trabajo de tesis, algunxs en su realización y otrxs generando un ambiente agradable en el día a día.

A mis directores Fernando y Pablo.

A Gaby Calamante y su equipo de trabajo, por el rescate.

A Dani Vilte por la ayuda constante.

A mis compañeros del laboratorio, Clau, Facu, Gla, Cris, Virginia y Enzo. Sin ellxs no podría haber realizado ni la mitad de las cosas que se presentan en esta tesis. Tanto por su ayuda concreta en el laboratorio como también por todo el tiempo que compartimos estos años. Hicieron que la frustración fuera más suave.

A Charle y Anita por estar ahí siempre.

A mis compañerxs tesistas Vani, Oli, Mica, Mica, Mica (muchas Micas), Sarah, Raquel, Cami, Lu, Lucas, Paloma, Agustín, Jesy, Vic, Joha, Maty y a lxs que me olvido también.

A mis otros compañeros del instituto, especialmente a Estelita, Vale, Sergio y Nacho.

A Alexandra Elbakyan, por su rebeldía pirata de comunista científica.

También a mis compañerxs de la cátedra de Enfermedades Infecciosas.

A Nora Guida y al LEEI.

A la Educación Pública que sin ella no estaría acá.

A mi familia y amigxs (que también son mi familia).

A Franco.

Muchas gracias

Índice

Agradecimientos	2
Índice.....	3
Abreviaturas.....	8
Resumen	12
Abstract	15
Capítulo 1.....	18
Enfermedades priónicas	19
Etiología y susceptibilidad genética	20
Tipos de EET	21
Scrapie.....	23
Patogenia	23
Transmisión.....	26
Otras EET animales	28
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB)	28
EEB en pequeños rumiantes	29
Enfermedad desgastante crónica (EDC).....	30
Otras enfermedades priónicas animales	31
Diagnóstico de scrapie	32
1. Diagnóstico clínico.....	32
2. Diagnóstico de laboratorio.....	32
Muestras para pruebas postmortem	33
Histopatología	33
Detección de PrP ^{res} mediante IHQ	34
Inmunotransferencia o Western blot (WB)	38
Pruebas rápidas.....	38
Diagnóstico preclínico de scrapie	38
Situación regional y nacional	41
Hipótesis y objetivos.....	45
Hipótesis	46

Objetivo General:.....	46
Objetivo Específico 1:.....	46
Objetivo Específico 2:.....	46
Objetivo Específico 3:.....	46
Capítulo 2.....	47
Caracterización del tejido linfoide asociado a mucosas de ovinos y caprinos de Buenos Aires y Salta.....	48
Materiales y Métodos.....	50
Animales evaluados.....	51
Muestras a analizar	52
Procesamiento histológico de las muestras.....	53
Identificación del TL en tercer párpado	54
Identificación del TL en mucosa rectal.....	54
Detección IHQ de marcadores celulares.....	54
Marcadores celulares a evaluar	57
Análisis estadístico	57
Resultados	59
Muestreo.....	60
Evaluación de la presencia del tejido linfoide asociado a mucosa rectal	60
Evaluación de la aptitud diagnóstica de las muestras	62
Caracterización de células del tejido linfoide	65
Células CD21+	65
Células CD3+	67
Células L1+	69
Análisis estadístico	70
Discusión.....	71
Detección de TL y evaluación de la aptitud diagnóstica de las muestras	72
Metodología empleada en la caracterización de poblaciones celulares.....	74
Caracterización de las poblaciones celulares del TL de las muestras.....	77
Conclusiones.....	79
Capítulo 3.....	81

Introducción.....	82
Materiales y métodos.....	83
Producción de PrP ^C ovina recombinante.....	84
Toma de muestras de sangre.....	84
Diseño de cebadores.....	84
Extracción del ADN genómico ovino.....	85
Amplificación de la región codificante del gen PRNP ovino.....	85
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	86
Clonado en el vector pGEM-T.....	86
Preparación de células competentes de E. coli.....	87
Transformación de células competentes.....	87
Extracción de plásmidos de E. coli por lisis alcalina.....	88
Electroforesis en geles de agarosa.....	88
Subclonado en el vector pRSET-B.....	89
Digestión con Enzimas de Restricción.....	90
Ligación.....	91
Verificación de la construcción pRSET-B-PRNPov.....	91
Expresión de PrP ^C rec ovina.....	91
Preparación del lisado celular.....	91
Preparación de la columna de purificación.....	92
Purificación de la PrP ^C rec ovina.....	92
Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	92
Tinción de azul brillante de Coomassie.....	93
Inmunotransferencia (Western blot).....	93
Determinación de la concentración de proteínas.....	93
Prueba de sensibilidad a la proteinasa K.....	94
Producción de anticuerpos de yema de huevo (IgY) anti PrP ^C rec.....	94
Inoculación de gallinas ponedoras con la PrP ^C rec ovina.....	94
Detección de anticuerpos anti-PrP ^C rec en el suero de las gallinas inoculadas.....	95
Extracción de anticuerpos de yema de huevo (IgY).....	95

Adsorción del extracto de IgY con E. coli BL21	96
Determinación de la inmunoreactividad de la IgY anti PrP ^C rec ovina	96
Diagnóstico de scrapie mediante IHC	96
Detección de PrP ^{Sc} a través de IHC utilizando IgY anti-PrP ^C	97
Detección de PrP ^C a través de IHC utilizando IgY anti-PrP ^C	97
Resultados	98
Amplificación y clonado del gen PRNP	99
Expresión de la PrP ^C rec	99
Purificación de PrP ^C rec	100
Evaluación de la sensibilidad a la PK	101
Detección de anticuerpos anti-PrP en el suero de las gallinas inoculadas	101
Producción de IgY contra PrP ^C rec ovina	102
Diagnóstico de scrapie mediante IHC	103
Detección de PrP ^{Sc} a través de IHC utilizando IgY anti-PrP ^C	103
Detección de PrP ^C a través de IHC utilizando IgY anti-PrP ^C	106
Discusión	108
Producción de la PrP ^C rec ovina	109
Optimización de la detección de PrP ^{Sc} y PrP ^C a través de inmunohistoquímica utilizando el extracto de IgY anti- PrP ^C rec	110
Conclusiones	113
Capítulo 4	115
Referencias	118
Anexo	148
Tamaño de muestreo estratificado con <i>ProMESA</i>	149
Análisis estadístico con <i>InfoStat</i>	149
Diferencias en el número de FL observados entre las muestras rectales	149
Diferencias en la aptitud diagnóstica entre las muestras rectales	150
Diferencias en la aptitud diagnóstica de tercer párpado completo observada entre el grupo J y el grupo G	150
Diferencias en la aptitud diagnóstica de mucosa rectal observada entre el grupo J y el grupo G	151

Diferencias en la aptitud diagnóstica de mucosa de tercer párpado observada entre el grupo J y el grupo G.....	152
Diferencias en marcación de CD21 en TL de tercer párpado entre el grupo J y el grupo G	153
Diferencias en marcación de CD21 entre el TL de la mucosa rectal y del tercer párpado ..	153
Secuenciaciones en formato FASTA.....	154
Datos de ovinos y caprinos	154
Datos de la marcación de CD21 en las muestras de tercer párpado de ovinos analizadas	158
Datos de la marcación de CD21 en las muestras de mucosa rectal de ovinos analizadas	158

Abreviaturas

μg microgramo

μl microlitro

Ac anticuerpo

ADN ácido desoxirribonucleico

AFC adyuvante completo de Freund

AFI adyuvante incompleto de Freund

Ag antígeno

BaCl₂ cloruro de bario

CaCl₂ cloruro de calcio

C-BSE EEB clásica

CDF células dendríticas foliculares

CPA célula presentadora de antígenos

DAB 2,3 diaminobenzidina

DO₆₀₀ densidad óptica medida a 600 nm}

EAF epitelio asociado a folículos

ECJ enfermedad de Creutzfeldt Jakob

EDC enfermedad de desgaste crónico

EDTA ácido etilendiaminotetraacético

EEB encefalopatía espongiforme bovina

EET encefalopatías espongiformes transmisibles

EEUU Estados Unidos

ELISA inmunoensayo enzimático

EPC enfermedad priónica del camello

ETV encefalopatía transmisible del visón

FL folículo linfoide

g gramo

h horas

H₂O agua

H₂O₂ peróxido de hidrógeno

H-BSE EEB atípica de alta masa molecular

HCl ácido clorhídrico

HRP peroxidasa del rábano, del inglés *horseradish peroxidase*

HyE coloración de hematoxilina y eosina

IgY anticuerpos de yema de huevo

IHQ inmunohistoquímica

IPTG isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido

K potasio

KCl cloruro de potasio

kDa kilodaltons

KH₂PO₄ fosfato monopotásico

kpb kilo pares de bases

l litro

LB Luria Bertani

L-BSE EEB atípica de baja masa molecular

LN linfonódulo

LvPR lentivirus de pequeños rumiantes

M molar

mA miliamperes

min minutos

ml mililitro

mm milímetro

mM milimolar

MnCl₂ cloruro de manganeso

MOPS 3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico

Na₂HPO₄ fosfato disódico

NaCl cloruro de sodio

NaOH hidróxido de sodio

NDNV Núcleo dorsal del nervio vago

OMSA Organización Mundial de Sanidad Animal

p/v relación masa/volumen

pb pares de bases

PBS buffer fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PIPES piperazino-N,N'-bis (ácido 2-etanesulfónico)

PK proteinasa K

PMCA amplificación cíclica de malplegamiento de proteínas, del inglés *protein misfolding cyclic amplification*

PRNPov región codificante del gen *PRNP* ovino

PrP proteína priónica

PrP^C proteína priónica celular normal

PrP^Crec PrP^C recombinante

PrP^{EDC} proteína priónica de EDC

PrP^{EEB} proteína priónica de EEB

PrP^{res} proteína priónica resistente a proteasas

PrP^{Sc} proteína priónica de scrapie

RA recuperación antigénica

RAIC Recuperación antigénica inducida por calor

RAIE recuperación antigénica inducida por enzimas

rpm revoluciones por minute

RT-QuIC conversión inducida por agitación en tiempo real, del inglés *real time-quaking induced conversion*

SDS dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

seg segundos

SFZ solución fijadora de zinc

SNC sistema nervioso central

SNE sistema nervioso entérico

SNP sistema nervioso periférico

TBM *tingible body macrophages*

TL tejido linfoide

TLAB tejido linfoide asociado a los bronquios

TLAC tejido linfoide asociado a la conjuntiva

TLAG tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal

TLAI tejido linfoide asociado al intestino

TLAM tejido linfoide asociado a mucosas

TLAN tejido linfoide asociado a la nasofaringe

V voltios

WB Western blot

WSU *Washington State University*

X-Gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

ZnCl cloruro de zinc

Resumen

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas producidas por priones que afectan al ser humano y a diferentes especies animales. Son de curso crónico, tienen manifestaciones neurológicas y terminan invariablemente con la muerte de los individuos afectados, careciéndose a la fecha de un tratamiento. De todas las EET animales, scrapie o prurigo lumbar que afecta a ovinos y caprinos, es la de mayor difusión, reportándose el mayor número de casos nuevos por año, y genera barreras comerciales para pequeños rumiantes. En la Argentina no se han identificado casos de scrapie ni de otras EET animales.

El diagnóstico de las EET se basa en la detección postmortem de la proteína priónica anómala (PrP^{Sc}) mediante inmunohistoquímica, Western blot o ELISA. En el caso de Scrapie es posible el diagnóstico antemortem de la enfermedad dada la particular acumulación temprana de PrP^{Sc} en tejido linfoide (TL). La PrP^{Sc} se acumula en los folículos linfoides de tonsilas, ganglios linfáticos y organizaciones linfáticas presentes en mucosas. Por su fácil acceso, se ha propuesto la detección de PrP^{Sc} en el TL del tercer párpado, evaluándose también la detección en biopsias de mucosa rectal.

El objetivo de esta tesis fue determinar si existen variaciones en el tejido linfoide asociado a mucosas de fácil acceso de ovinos y caprinos en relación a su edad, evaluar su composición, y obtener herramientas diagnósticas para scrapie. Para eso se evaluó la aptitud diagnóstica de muestras de biopsia del tercer párpado y recto de ovinos y caprinos de las provincias de Buenos Aires y Salta respectivamente y se caracterizaron sus componentes celulares. A su vez, se desarrolló un anticuerpo anti PrP^C y se optimizó una técnica de inmunohistoquímica (IHQ) para reconocer esta proteína y PrP^{Sc} en muestras de ovinos sanos y con scrapie, y bovinos con EEB.

Se tomaron postmortem muestras de mucosa del tercer párpado y mucosa rectal (simulando una biopsia), y el párpado contralateral de 66 ovinos (30 mayores y 36 menores de 18 meses) y 54 caprinos. También se colectó la porción terminal del recto y el ano de 35 ovinos. Se fijaron en formol al 10% y posteriormente se procesaron para su análisis histológico. La bibliografía considera muestras aptas para diagnóstico aquellas que presenten un mínimo 6 folículos linfoides. De acuerdo al mismo fueron aptas solo el 1,8% de las muestras conjuntivales y el 39,4% de las muestras rectales de los ovinos. En cuanto a los caprinos, el 5,4 y 61,1% de las muestras de mucosas de tercer párpado y rectal respectivamente cumplieron el criterio de aptitud para diagnóstico de scrapie. En la evaluación histológica del párpado contralateral se encontró tejido linfoide solo en el 16,7% de los ovinos y el 50% de los en caprinos. Por otro lado, en el estudio de recto y ano se observó tejido linfoide inmediatamente posterior a la unión mucocutánea (23 muestras aptas para el diagnóstico/35 total), el cual disminuiría su presencia hacia craneal (6/35 de las muestras tomadas a 2 cm de la unión fueron aptas). Estos resultados sugieren que la biopsia de tercer párpado no sería de utilidad para el diagnóstico de scrapie debido al escaso desarrollo del TL. Por otro lado, la biopsia de mucosa rectal sería de utilidad, debiendo considerarse la presencia de tejido linfoide en cantidad suficiente al momento del diagnóstico. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre

los dos grupos etarios evaluados (mayores y menores a 18 meses), por lo cual la edad no tendría influencia en la aptitud de estas muestras.

La técnica de IHQ fue de utilidad para la caracterización de poblaciones de células del sistema inmune. Se detectaron células CD21+, CD3+ y L1+ en ambas especies, sin diferencias en los patrones de inmunomarcación respecto de la especie o edad. Se observaron células CD21+ en el interior de los folículos linfoides principalmente en los centros germinativos. Esto era de esperarse ya que es un marcador de células dendríticas foliculares (CDF) y linfocitos B maduros, los cuales tienen esa localización. Existieron diferencias significativas en la marcación de CD21 entre las muestras rectales y de tercer párpado de ovinos, encontrando una proporción de folículos linfoides densamente empaquetados con escasa o nula presencia de células CD21+ en las muestras de tercer párpado. Debido a las diferencias encontradas y la importancia de la presencia de CDF (CD21+) para la acumulación de PrP^{Sc} en el TL de los animales infectados, debería considerarse la presencia de centros germinativos en la determinación de la aptitud diagnóstica de las muestras para el diagnóstico de scrapie.

Las células CD3+ se observaron con una distribución perifolicular principalmente, coincidente con la distribución de linfocitos T. Sin embargo, también se observó marcación en células de los folículos. Las células L1+ se encontraron en baja cantidad en regiones interfoliculares coincidente con la distribución de macrófagos. Esto concuerda con lo descrito por otros autores.

A partir de obtener una PrP^C recombinante, se logró producir un anticuerpo IgY capaz de detectar por IHQ PrP^C ovina y PrP^{Sc} en tejidos de ovinos y bovinos con scrapie y EEB. El patrón de inmunomarcación observado en los tejidos fue similar al obtenido mediante el uso de anticuerpos comerciales.

No se logró detectar PrP^C en tejido linfoide fijado en formol 10% con el anticuerpo desarrollado ni con los anticuerpos comerciales utilizados, en contrario a lo reportado por otros autores. Esto tendría relación con el fijador y/o procedimientos realizados, como con la menor capacidad de detección de los anticuerpos utilizados en este trabajo.

Los resultados del presente trabajo indican que la presencia de tejido linfoide en las mucosas evaluadas no estaría asociado a la edad de los ovinos. En la mucosa palpebral tendría un menor desarrollo, siendo fácilmente detectable en el recto, inmediatamente anterior a la unión mucocutánea. Esta sería la muestra de elección en caso de implementarse una estrategia de diagnóstico preclínico de scrapie. El anticuerpo desarrollado podría ser de utilidad en el futuro en ensayos para diagnóstico de EET animales. Para ello serán necesarios futuros estudios a fin de caracterizar concentraciones de trabajo e insumos para revelado.

Abstract

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) are a group of neurodegenerative diseases produced by prions that affect humans and different animal species. They have a chronic course, neurological manifestations and invariably end with the death of the affected individuals, lacking treatment to date. Of all the animal TSEs, scrapie affects sheep and goats is the most widespread animal TSE, reporting the highest number of new cases per year, and creates trade barriers for small ruminants. In Argentina, no cases of scrapie or other animal TSEs have been identified.

The diagnosis of TSEs is based on postmortem detection of abnormal prion protein (PrP^{Sc}) by immunohistochemistry, Western blotting, or ELISA. In the case of scrapie, antemortem diagnosis of the disease is possible given the particular early accumulation of PrP^{Sc} in lymphoid tissue (LT). PrP^{Sc} accumulates in lymphoid follicles of tonsils, lymph nodes, and mucosal lymphatic organizations. Due to its easy access, the detection of PrP^{Sc} in the LT of the third eyelid has been proposed, also evaluating the detection in rectal mucosa biopsies.

The objective of this thesis was to determine if there are variations in the lymphoid tissue associated with easily accessible mucosa of sheep and goats in relation to their age, to evaluate their composition, and to obtain diagnostic tools for scrapie. For this, the diagnostic aptitude of biopsy samples from the third eyelid and rectum of sheep and goats from the provinces of Buenos Aires and Salta, respectively, was evaluated and their cellular components were characterized. In turn, an anti-PrP^C antibody was developed and an immunohistochemistry (IHC) technique was optimized to recognize this protein and PrP^{Sc} in samples from infected sheep and cattle.

Postmortem mucosa samples were taken from the third eyelid and rectal mucosa (simulating a biopsy), and the contralateral eyelid of 66 sheep (30 over and 36 under 18 months) and 54 goats. The terminal portion of the rectum and anus of 35 sheep were also collected. They were fixed in 10% formalin and subsequently processed for histological analysis. The bibliography considers samples suitable for diagnosis to be those that present a minimum of 6 lymphoid follicles. According to it, only 1.8% of the conjunctival samples and 39.4% of the rectal samples of sheep were suitable. Regarding goats, 5.4 and 61.1% of the third eyelid and rectal mucosa samples respectively met the aptitude criteria for diagnosis of scrapie. In the histological evaluation of the contralateral eyelid, lymphoid tissue was found only in 16.7% of the sheep and 50% of the goats. On the other hand, in the study of the rectum and anus, lymphoid tissue was observed immediately after the mucocutaneous junction (23 samples suitable for diagnosis/35 total), which would decrease its presence towards the cranium (6/35 of the samples taken at 2 cm of the union were suitable). These results suggest that biopsy of the third eyelid would not be useful for the diagnosis of scrapie due to the scarce development of LT. On the other hand, a biopsy of the rectal mucosa would be useful, considering the presence of lymphoid tissue in sufficient quantity. No statistically significant differences were found

between the two age groups evaluated (over and under 18 months), so age would not influence the aptitude of these samples.

The IHC technique was useful for the characterization of cell populations of the immune system. CD21+, CD3+ and L1+ cells were detected in both species, with no differences in immunolabeling patterns with respect to species or age. CD21+ cells were observed inside the lymphoid follicles mainly in the germinal centers. This was to be expected since it is a marker of dendritic cells and mature B lymphocytes, which have this location. There were significant differences in CD21 labeling between rectal and third eyelid samples from sheep, finding a proportion of densely packed lymphoid follicles with scarce or no presence of CD21+ cells in third eyelid samples. Due to the differences found and the importance of the presence of CDF (CD21+) for the accumulation of PrP^{Sc} in the LT of infected animals, the presence of germinal centers should be considered in determining the diagnostic aptitude of the samples for the diagnosis of scrapie.

CD3+ cells were observed with a mainly perifollicular distribution, consistent with the distribution of T lymphocytes. However, labeling was also demonstrated in cells from the follicles. L1+ cells were found in low numbers in interfollicular regions consistent with the distribution of macrophages. This coincides with what has been described by other authors.

From a recombinant PrP^C, it was possible to produce an IgY antibody capable of detecting ovine PrP^C and PrP^{Sc} by IHC in ovine and bovine tissues with scrapie and BSE. The immunostaining pattern observed in the tissues was similar to that obtained using commercial antibodies.

It was not possible to detect PrP^C in lymphoid tissue fixed in 10% formalin with the antibody developed or with the commercial antibodies used, contrary to what was reported by other authors. This would be related to the fixative and/or procedures performed, as well as the lower detection capacity of the antibodies used in this work.

The results of this work indicate that the presence of lymphoid tissue in the evaluated mucosa would not be associated with the age of the sheep. In the palpebral mucosa it would have less development, being easily detectable in the rectum, immediately before the mucocutaneous junction. This would be the sample of choice in the event of implementing a scrapie preclinical diagnosis strategy. The antibody developed could be useful in the future in assays for the diagnosis of animal TSEs. For this, future studies will be necessary in order to characterize concentrations of work and inputs for developing.

Capítulo 1

Introducción

Enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas son un grupo de trastornos neurodegenerativos que afectan a los seres humanos y varias especies animales. Estas enfermedades también se conocen como encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) debido a los cambios microscópicos que producen en el sistema nervioso central (SNC) y su capacidad de transmisión entre individuos susceptibles. Las enfermedades dentro de este grupo incluyen a la enfermedad de Creutzfeldt Jakob (ECJ) en humanos, scrapie o prurigo lumbar en ovejas y cabras y la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) entre otras. Todas ellas tienen un curso crónico con manifestaciones neurológicas y culminan en la muerte de los individuos afectados ya que no existe un tratamiento curativo para estas patologías.

La relevancia de estas enfermedades ha ido cambiando a lo largo de los años. La EEB provocó fuertes cambios en la producción animal a fines del siglo XX, pero su importancia disminuyó con la implementación de medidas de control. Sin embargo, a pesar de estas medidas la EEB y otras enfermedades priónicas todavía son diagnosticadas en todo el mundo. Recientemente se informó de un nuevo trastorno denominado enfermedad priónica del camello (EPC) en dromedarios de Argelia (Babelhadj et al., 2018). Este hallazgo indica que las enfermedades priónicas siguen siendo relevantes para la producción animal y la salud pública.

Las enfermedades priónicas animales se conocen desde 1732, cuando se describió el scrapie en una oveja merina en España y más tarde en Gran Bretaña (Liberski, 2012). Durante la década de 1960, se describieron enfermedades similares en visones y ciervos en América del Norte, enfermedades luego conocidas como encefalopatía transmisible del visón (ETV) y enfermedad de desgaste crónico (EDC), respectivamente. Pero fue en 1986 cuando las enfermedades priónicas animales cobraron mayor relevancia. En ese año, se realizó la primera descripción de una enfermedad similar a scrapie que afectaba al ganado bovino. Debido al aspecto microscópico del encéfalo de los animales afectados y a su transmisibilidad se la denominó encefalopatía espongiforme bovina (EEB) (Wells et al., 1987), cuyo impacto fue mayor que el de otras enfermedades priónicas debido a la importancia económica de esta especie. El interés por estas patologías aumentó significativamente en 1996, cuando se relacionó a la EEB con una variante de la ECJ en humanos y, por lo tanto, se consideró una zoonosis (Bruce et al., 1997; Will et al., 1996). Debido a la gravedad de la enfermedad y el riesgo que representaba para los animales y los humanos, se implementaron con éxito medidas estrictas para reducir la transmisión de la EEB y el número de nuevos casos ha disminuido drásticamente en los últimos años. En la actualidad la EDC se convirtió en la enfermedad priónica animal más preocupante porque se ha demostrado que es capaz de mantenerse en poblaciones de animales silvestres y se ha extendido por grandes áreas. Inicialmente limitada a algunos estados de los Estados Unidos (EE. UU.) y Canadá, la EDC ha sido detectada recientemente en otras regiones de ambos países (Rivera et al., 2019) y también en Noruega, Suecia y Finlandia (Benestad et al., 2016; Koutsoumanis et al., 2019). Además, se ha propuesto que la EDC podría representar una

enfermedad zoonótica y, por lo tanto, un riesgo potencial para la salud pública (Hannaoui et al., 2017).

Etiología y susceptibilidad genética

Aunque las EET se conocen desde hace siglos, el agente etiológico se caracterizó a finales del siglo XX cuando se postuló la hipótesis del prion (Prusiner, 1982). Se propuso que scrapie es causada por una isoforma mal plegada de la proteína priónica celular normal (PrP^{C}), que se encuentra constitutivamente en las células nucleadas de todas las especies superiores con una concentración más alta en el SNC. La forma mal plegada se denominó originalmente proteína priónica resistente a proteasas (PrP^{res}) o proteína priónica de scrapie (PrP^{Sc}). La conversión de PrP^{C} en PrP^{res} es un proceso postraducciona que aún no se ha dilucidado por completo.

La estructura primaria de PrP^{C} consiste en 256 aminoácidos en ovejas, que varía ligeramente entre especies animales. La estructura secundaria de la PrP^{C} es principalmente helicoidal (40% de hélice α y 3% de lámina β) cuando se solubiliza en detergentes en ausencia de cationes. La formación de PrP^{res} conduce a una modificación de estructuras secundarias (30% hélice α y 45% lámina β) que modifican sus características bioquímicas (Pan et al., 1993). Mientras que PrP^{C} es completamente degradada por proteasas, PrP^{res} es parcialmente resistente. Por esta razón, PrP^{res} se acumula en neuronas y células gliales, provocando la vacuolización de la sustancia gris con el cambio microscópico "espongiforme" que caracteriza a las enfermedades priónicas.

Al igual que otros agentes infecciosos, los priones presentan variedades de cepas que pueden causar diferentes periodos de incubación, signos clínicos, lesiones y diferentes comportamientos bioquímicos. Aunque no se ajusta totalmente al concepto clásico de "cepa" utilizado en microbiología (ya que este agente no posee ácidos nucleicos), es un término utilizado desde 1968 en las investigaciones referidas a enfermedades priónicas (Dickinson et al., 1968; Zink, 2021). De esta manera pueden diferenciarse cepas de PrP^{res} provenientes de diferentes orígenes. Principalmente se utilizan los siguientes parámetros para caracterizar cepas de priones:

- Propiedades biológicas: basadas en períodos de incubación, signos clínicos, lesiones histopatológicas, distribución de PrP^{res} y especies susceptibles.
- Propiedades bioquímicas: estabilidad frente a agentes desnaturalizantes, patrones de glicosilación, movilidad electroforética después de la digestión con proteinasa K (PK) y resistencia a la degradación proteolítica.

La PrP^{C} está codificada en el gen *PRNP* y se expresa en niveles elevados en el SNC, asociada principalmente a neuronas y astrocitos con niveles más bajos presentes en oligodendrocitos y microglía. También se puede encontrar en otros tejidos como músculo, sistema nervioso periférico (SNP) o tejido linfóide (TL), pero en menor cantidad que en el SNC (Watts et al., 2018). Aunque se desconoce la función de la PrP^{C} , se ha demostrado que su ausencia en

ratones *knockout* vuelve al animal resistente a las enfermedades priónicas (Weissmann & Flechsig, 2003). Por tanto, la expresión de esta proteína en las células de individuos susceptibles es una condición necesaria para el desarrollo de estas enfermedades.

A diferencia de otras EET, se ha descrito una asociación entre el riesgo de infección por scrapie y algunos genotipos de ovejas. Esta susceptibilidad genética a la enfermedad viene dada por el polimorfismo del gen *PRNP* y principalmente a variaciones en los aminoácidos codificados en tres codones: 136, 154 y 171. De estas combinaciones surgen 5 alelos (VRQ, ARQ, AHQ, ARH y ARR) con 15 posibles genotipos (Goldmann, 2008). Entre estos, el genotipo VRQ/VRQ confiere alta susceptibilidad a scrapie, mientras que ARR/ARR se asocian con baja susceptibilidad (Baylis et al., 2004). De esta forma, la infección depende de la exposición al agente infeccioso y de la susceptibilidad genética del individuo. Estos hallazgos llevaron al desarrollo de programas de control en Europa con el objetivo de eliminar aquellos individuos con genotipos susceptibles a scrapie (Melchior et al., 2010).

En cabras, se han descrito alrededor de 50 polimorfismos del gen *PRNP*. Sin embargo, no se ha determinado con la misma precisión que en las ovejas si existe una correlación directa entre los genotipos caprinos y la susceptibilidad de contraer scrapie (Greenlee, 2019).

En otras EET no se ha demostrado predisposición genética. Algunos estudios en bovinos revelaron que algunas regiones fuera de la región codificante del gen *PRNP* están asociadas con variaciones en la susceptibilidad a EEB (Vernerova et al., 2014). A pesar de eso, la genética no es un aspecto considerado en los programas actuales de prevención de la EEB. En el caso de la EDC, afecta a varias especies de cérvidos, por lo que la susceptibilidad o resistencia genética dependerá de cada una de ellas. Se han realizado estudios en algunas especies, pero no se han observado resultados sustanciales (Mead et al., 2019).

Tipos de EET

Las EET animales hasta aquí mencionadas son denominadas Clásicas debido a que respetan aspectos clínicos, patológicos y moleculares descritas en la bibliografía. En 1998, se notificaron en Noruega algunos casos de scrapie que no respondían a la distribución típica de lesiones espongiiformes (Benestad et al., 2003). Esta nueva forma de enfermedad se llamó originalmente Nor98 y actualmente se conoce como scrapie atípico. La distribución de PrP^{Sc} difiere en ambas formas de enfermedad, con una acumulación mínima de priones en el tronco encefálico y una mayor distribución en el cerebelo y la corteza cerebral en la forma atípica (Benestad et al., 2008; Moore et al., 2008; Nentwig et al., 2007). Además de las diferencias en la distribución de los depósitos de priones y los signos clínicos, estas formas también varían en las características bioquímicas como los sitios de glicosilación y clivaje. Por ejemplo, se ha demostrado un patrón diferencial de bandas en ensayos electroforéticos (Benestad et al., 2008). En cuanto a la susceptibilidad genética, el scrapie atípico puede afectar a ovejas con genotipos resistentes a la forma clásica (Buschmann et al., 2004; De Bosschere et al., 2007). Sin embargo, los

polimorfismos en los codones 141 (fenilalanina) y 154 (histidina) se han asociado en gran medida con casos de scrapie atípico en ovejas (Moum et al., 2005).

En 2004, se detectaron casos de vacas con características diferentes a los informados anteriores de EEB en Italia (Casalone et al., 2004) y Francia (Biacabe et al., 2004). Además, los priones aislados eran diferentes entre sí. Básicamente, mostraron fragmentos de péptidos con diferente tamaño molecular después de la digestión con proteasas. El prion con fragmentos más grandes que los casos típicos de EEB se denominó H-BSE; el otro con un fragmento de menor masa molecular se denominó L-BSE. Entonces, la forma típica de enfermedad comenzó a denominarse EEB clásica (C-BSE) y la H y L-BSE se reconocen como “formas atípicas de EEB”. Debido a su baja prevalencia, es difícil investigar casos atípicos de EEB en su estado natural, pero la enfermedad se ha reproducido experimentalmente. En estos estudios se observó que la región del óbex en el tallo cerebral no es la región con mayor acumulación de PrP^{Sc}, distribuyéndose de manera más uniforme por todo el encéfalo (Priemer et al., 2013).

El scrapie atípico y la EEB atípica ocurren generalmente en animales de edad avanzada y tienen una distribución esporádica y baja prevalencia, a diferencia de las formas clásicas de estas enfermedades (P. Brown et al., 2006; Fediaevsky et al., 2008; Sala et al., 2012). Además, se han notificado casos atípicos en países o regiones donde las formas clásicas son enfermedades exóticas como los casos de H-BSE en Noruega, Suecia y Brasil (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2020) o casos de scrapie atípico en Nueva Zelanda (Kittelberger et al., 2010), Australia (Cook et al., 2016) y las Islas Malvinas (Epstein et al., 2005). Estos hallazgos sugieren que el origen de la forma atípica de estas enfermedades es completamente diferente al origen de la forma clásica.

Aunque el primer caso notificado de scrapie atípico fue en 1998, estudios retrospectivos mostraron que han existido casos atípicos desde al menos 1987 (Webb et al., 2009). La transmisibilidad potencial del scrapie atípico se verificó experimentalmente por vía intracraneal y oral en ovejas (Simmons et al., 2007, 2011) y ratones transgénicos ovinizados (que expresan PrP^C ovino) (Le Dur et al., 2005). Sin embargo, no hay evidencia de que el scrapie atípico se transmita en condiciones naturales. La ausencia de transmisión horizontal podría estar relacionada con la falta de distribución y acumulación de PrP^{Sc} en los tejidos periféricos de los animales afectados (Benestad et al., 2003; Buschmann et al., 2004; Nentwig et al., 2007). Sin embargo, un estudio demostró que, en casos naturales y experimentales de scrapie atípico en ovejas, los tejidos periféricos pudieron ser infecciosos para ratones transgénicos, aunque la PrP^{Sc} no se detectó mediante técnicas clásicas como inmunohistoquímica, ELISA o inmunotransferencia (Andréoletti et al., 2011). De esta manera, la PrP^{Sc} podría estar presente en pequeñas cantidades probablemente por debajo de la sensibilidad analítica de esas técnicas, siendo infectivos los tejidos a pesar de no detectarse el agente.

En el caso de la EEB atípica, la infectividad tanto del tipo H como del tipo L pudo demostrarse en ratones transgénicos con sobreexpresión de PrP^C bovina (Buschmann et al., 2006), y luego

por vía intracraneal en ganado bovino (Balkema-Buschmann et al., 2011; Lombardi et al., 2008). También se ha demostrado la infectividad del tejido nervioso periférico y el músculo esquelético en bovinos infectados experimentalmente con L-BSE y H-BSE (Sawada et al., 2019). Sin embargo, la vía oral no sería una vía de transmisión eficiente según los resultados en bovinos desafiados con L-BSE (Okada et al., 2017). Solo 1 de 16 terneros inoculados por vía oral desarrolló signos clínicos leves después de 88 meses de incubación, y ese individuo había sido inoculada con una dosis alta de homogeneizado de cerebro infectado con L-BSE.

En base a estos resultados ya los datos epidemiológicos, se cree que las formas atípicas de las enfermedades priónicas tienen un origen espontáneo y su transmisión puede ser muy baja o nula en condiciones naturales.

Scrapie

Considerando las enfermedades priónicas de los animales, scrapie es la más conocida. Ha sido el prototipo para el estudio de las enfermedades priónicas y es la más extendida, con el mayor número de casos nuevos notificados (EFSA, 2021). Además, aunque no ha habido evidencia de transmisión de scrapie a humanos, se ha postulado un riesgo potencial ya que se ha transmitido a primates y también a ratones transgénicos que sobreexpresan PrP^C humana nativa (Cassard et al., 2014; Comoy et al., 2015).

El scrapie afecta a ovejas, cabras y muflones en condiciones naturales pero la infección se ha logrado experimentalmente en ratas (Chandler & Fisher, 1963), ratones (Chandler, 1961), hámsteres (Zlotnik & Rennie, 1965), diferentes tipos de monos (Baker et al., 1993; Comoy et al., 2015; Gibbs et al., 1980) y otras especies. Así, más allá de su riesgo hipotético para otras especies, la propagación de scrapie entre los pequeños rumiantes crea barreras comerciales para las ovejas y las cabras y sus productos derivados.

Patogenia

La ruta natural de infección es incierta, pero es ampliamente aceptado que existe transmisión horizontal, siendo la vía oral la más probable (Greig, 1940). En condiciones experimentales, siguiendo la vía oral se observó que luego de ingresar la PrP^{Sc} se deposita en tejido linfoide, como tonsilas, placas de Peyer, linfonódulos mesentéricos y tejido linfoide asociado al intestino (TLAI) (Andreoletti et al., 2000). Desde allí, el agente se propaga al sistema nervioso entérico (SNE), que forma parte del SNP (Heggebø et al., 2003; McBride et al., 2001).

Después de la infección oral, la PrP^{Sc} debe atravesar el epitelio del tracto gastrointestinal para llegar al tejido linfoide donde puede ser encontrada en las primeras etapas de la enfermedad. Se han propuesto varios mecanismos, y el más aceptado incluye la transcitosis por células M (Heppner et al., 2001; Miyazawa et al., 2010) y posiblemente la captura y transporte por células dendríticas migratorias (Huang et al., 2002; Huang & MacPherson, 2004).

A nivel celular, las células dendríticas foliculares (CDF) parecen jugar un papel importante en la patogénesis del scrapie. Estas células están presentes en los folículos linfoides (FL) y expresan cantidad moderada de PrP^C en condiciones normales (McBride et al., 1992). Se ha demostrado que la presencia de CDF es esencial para el desarrollo de la enfermedad ya que la infección de scrapie fue ineficaz en ratones con deficiencia de CDF (K. F. D. Brown et al., 1999; Mabbott et al., 2000). Los linfocitos B también son importantes, pero probablemente porque son necesarios en la maduración y el mantenimiento de las CDF (Bruce et al., 2000; Prinz et al., 2003). Igualmente pueden estar involucrados en la primera etapa de diseminación desde los sitios de acumulación más tempranos hasta órganos linfoides secundarios como el bazo a través de la sangre y la linfa (J. C. Edwards et al., 2010; Mok et al., 2012). Los macrófagos son otras células donde pueden encontrarse acumulaciones tempranas de PrP^{Sc}, especialmente en los denominados *tingible body macrophages* (TBM). Estas células están presentes en los centros germinales de los folículos linfoides y su función es fagocitar linfocitos apoptóticos que se observan al microscopio como “cuerpos teñibles” (de ahí su nombre en inglés). Algo similar ocurriría con los priones acumulados y fagocitados (Heggebø et al., 2002; Herrmann et al., 2003). Todos estos mecanismos están representados en la figura 1.

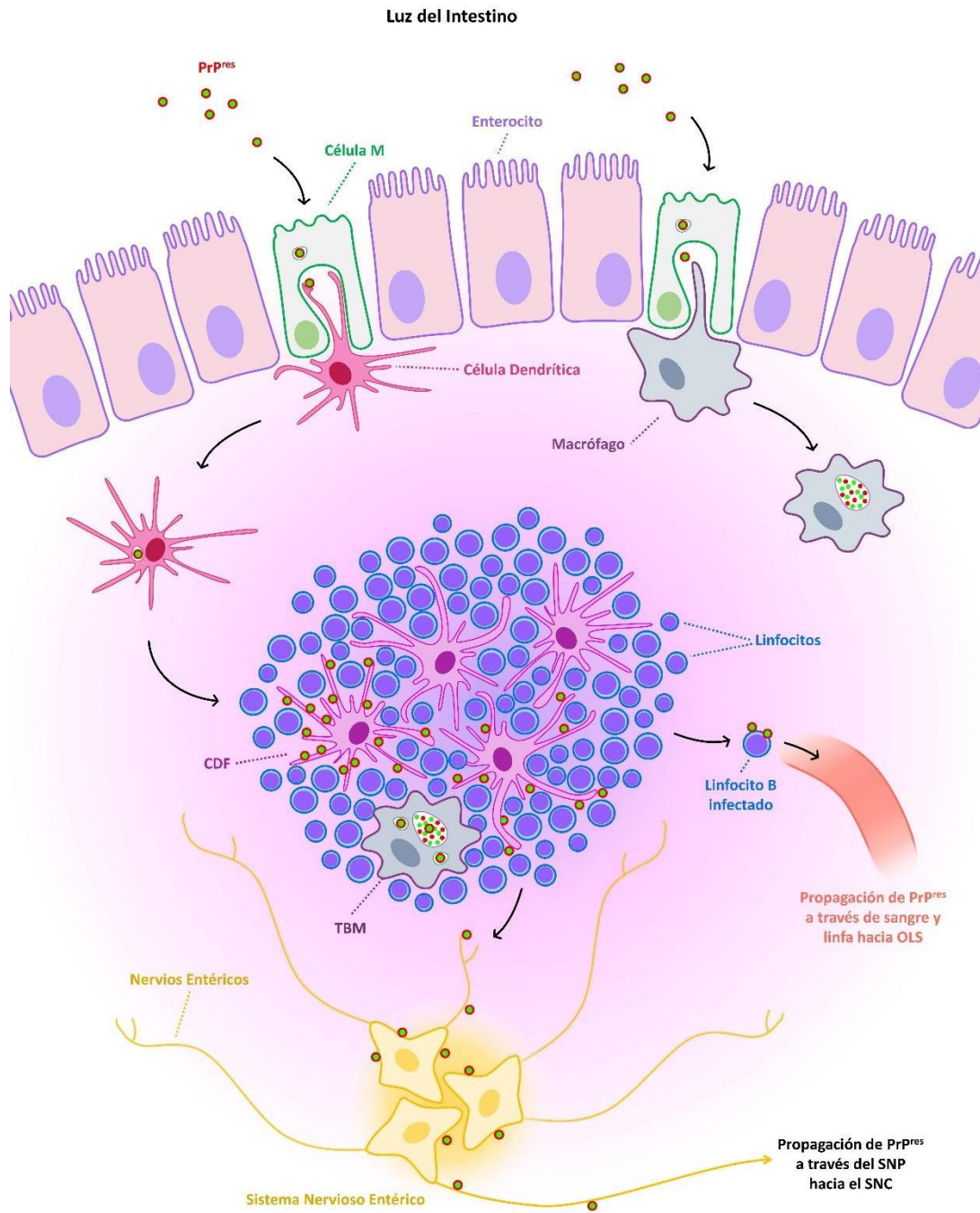


Figura 1. Representación gráfica de la posible diseminación de PrP^{res} desde la luz del intestino. TBM: *tingible body macrophages*; CDF: células dendríticas foliculares; OLS: órganos linfoides secundarios; SNP: sistema nervioso periférico; SNC: sistema nervioso central.

El SNE sería el sitio inicial de neuroinvasión de PrP^{Sc} (Chiocchetti et al., 2008). Después de que la PrP^{Sc} invade el SNE, es diseminada de forma retrógrada a través de fibras nerviosas simpáticas y

parasimpáticas eferentes que inervan el intestino, al núcleo motor dorsal del nervio vago (NDNV) en el bulbo raquídeo y la región torácica de la médula espinal (Van Keulen et al., 2002).

En cuanto a sistema inmune de los individuos afectados, en los animales con scrapie, la PrP^{Sc} no estimula una respuesta humoral apreciable probablemente debido a que su secuencia de aminoácidos es idéntica a la de PrP^C (Porter et al., 1973). Tampoco se suelen observar cambios inflamatorios en los tejidos lesionados (Jeffrey & González, 2004).

Transmisión

La principal fuente de infección de PrP^{Sc} serían las hembras preñadas infectadas, las cuales al momento del parto eliminarían gran cantidad de PrP^{Sc} en sus placentas. Los animales susceptibles se infectarían al ingerir al agente durante o posterior al parto (Andréoletti et al., 2002; Garza et al., 2017; Lacroux et al., 2007; Tuo et al., 2002).

Al igual que con otras enfermedades transmisibles, las fuentes de contaminación ambiental están involucradas en la propagación de scrapie. Las secreciones y excreciones de los individuos afectados pueden contribuir a la transmisión horizontal. Se detectó PrP^{Sc} en heces y orina de ovejas naturalmente infectadas con scrapie (Rubenstein et al., 2011; Terry et al., 2011) y también en saliva (Maddison et al., 2010; Tamgüney et al., 2012).

La transmisión vertical parece ser otra forma importante de mantener el scrapie en rebaños de cabras y ovejas. Existe una mayor incidencia de scrapie en las crías de ovejas afectadas naturalmente (Hoinville et al., 2010), aunque esto podría deberse a varias formas de transmisión. Una posible explicación a esta alta incidencia podría ser la transmisión a través de la leche o el calostro que ha sido demostrada en ovejas y cabras (Konold et al., 2008, 2013, 2016; Zhuang et al., 2018) y también ha sido demostrada la transmisión *in útero* en ovejas con un genotipo susceptible (Foster et al., 2013).

Ya en la década de 1970, la transmisión de scrapie a las ovejas se había demostrado mediante la administración oral de membranas fetales (Pattison et al., 1972, 1974), incluso antes de que se conociera el agente causal. Estudios posteriores evidenciaron que la acumulación de PrP^{Sc} depende del genotipo del gen *PRNP* en el feto. Las ovejas infectadas con scrapie pueden acumular grandes cantidades de PrP^{Sc} en placentomas solo si el feto posee un genotipo susceptible de contraer la enfermedad (Andréoletti et al., 2002; Garza et al., 2017; Lacroux et al., 2007; Tuo et al., 2002). Este descubrimiento fue fundamental para el desarrollo de programas de control de cría que se implementaron en diferentes países. En el caso de las cabras con scrapie adquirida naturalmente, la acumulación de PrP^{Sc} en los tejidos placentarios es baja (O'Rourke et al., 2011). A pesar de la pequeña cantidad de PrP^{Sc}, los tejidos placentarios de las cabras mantienen su potencial infeccioso y ha sido posible transmitir scrapie a corderos y cabritos al administrar placenta infectada por vía oral (Schneider et al., 2015). Estos estudios

revelaron que los tejidos placentarios son una fuente importante de infección que podría contaminar el medio ambiente durante la temporada de partos.

También se ha indicado que la acumulación de PrP^{Sc} aumenta en presencia de inflamación crónica en determinados tejidos. Considerando la transmisión, este hecho cobra relevancia cuando se produce una inflamación crónica en órganos relacionados con la excreción o secreción. Por ejemplo, la transmisión de scrapie a través de la leche puede verse potenciada por la mastitis crónica en ovejas y cabras con coinfección lentiviral (Lacroux et al., 2008; Ligios et al., 2011). Esta potenciación probablemente se deba a la acción de los lentivirus de pequeños rumiantes (LvPR) que producen una reacción inflamatoria que favorece la acumulación de PrP^{Sc} en el sitio de la inflamación (González et al., 2010; Salazar et al., 2010; Zhuang et al., 2018). Este hallazgo es importante ya que las infecciones por LvPR son altamente prevalentes y endémicas a nivel mundial, y podrían actuar como potenciadores en la transmisión y perpetuación del scrapie en rebaños de ovejas y cabras.

Fuentes de infección	Métodos de detección	Referencias
<i>Tejidos placentarios</i>	Transmisión a ovejas, cabras y ratones; detección de PrP ^{Sc} por inmunotransferencia, IHQ y ELISA	Andréoletti et al., 2002; Lacroux et al., 2007; O'Rourke et al., 2011; Onodera et al., 1993; Pattison et al., 1972, 1974; R. E. Race et al., 1998; Tuo et al., 2002
<i>Leche y calostro</i>	Transmisión a ovejas, cabras y ratones transgénicos ovinizados; detección de PrP ^{Sc} por PMCA	Konold et al., 2008, 2013, 2016; Lacroux et al., 2008; Maddison et al., 2009; Zhuang et al., 2018
<i>Materia fecal</i>	Detección de PrP ^{Sc} por PMCA	Terry et al., 2011
<i>Orina</i>	Detección de PrP ^{Sc} por PMCA	Rubenstein et al., 2011
<i>Saliva</i>	Transmisión a ratones transgénicos ovinizados; detección de PrP ^{Sc} por PMCA	Gough et al., 2012; Maddison, et al., 2010; Tamgüney et al., 2012
<i>Semen</i>	Transmisión a ratones transgénicos ovinizados; detección de PrP ^{Sc} por PMCA	Rubenstein et al., 2012
<i>Sangre</i>	Transmisión a ovejas y detección de PrP ^{Sc} por PMCA	Houston et al., 2008; Thorne & Terry, 2008

Tabla 1. Resumen de posibles fuentes de infección de scrapie en ovinos y caprinos. (IHQ): inmunohistoquímica; (ELISA): inmunoensayo enzimático; (PMCA): amplificación cíclica de malplegamiento de proteínas.

Otras EET animales

Encefalopatía espongiforme bovina (EEB)

El primer caso de EEB clásica se notificó en 1986 (Wells et al., 1987), y dos años después se pudo comprobar su transmisibilidad mediante la inoculación en ratones (Fraser et al., 1988). Aunque el origen del brote sigue siendo incierto, la transmisión de la EEB ha sido bien estudiada en los años posteriores debido al riesgo de transmisión a humanos. Se realizaron muchos estudios epidemiológicos para comprender esta nueva enfermedad y se encontró que la incidencia de la EEB era mayor en los rodeos lecheros que en los de carne, y esto podría haberse debido a las diferencias en los modos de alimentación de ambos sistemas de producción (Bradley, 1991; Wilesmith et al., 1992). En base a estos datos epidemiológicos y la ausencia de transmisión horizontal directa, se estableció que la principal fuente de infección de la EEB eran los alimentos que contenían harina de carne y huesos con los que se alimentaba al ganado (Anderson et al., 1996). Este hecho llevó a la prohibición de alimentar al ganado con proteínas de rumiantes en varios países.

La patogenia de la EEB, siguiendo la vía oral, es similar a la de scrapie en las primeras etapas. La PrP^{EEB} se deposita inicialmente en las placas de Peyer, TLAG y tonsilas, y luego se distribuye al SNC a través del SNP (Hoffmann et al., 2007, 2011; Terry et al., 2003; Wells et al., 2005). La principal diferencia con scrapie es que los individuos afectados con EEB presentan una escasa o nula distribución de priones en el tejido linfoide, a excepción de los ya mencionados (Birkett et al., 1997; Espinosa et al., 2007; Wells et al., 1998).

Debido a nuevos casos de EEB en animales nacidos después de la prohibición de alimentación en el Reino Unido, algunos investigadores sospecharon que también era posible la transmisión vertical (Curnow & Hau, 1996; Lacey & Dealler, 1994). Algunos estudios de cohortes indicaron un mayor riesgo de desarrollar EEB en terneros nacidos de madres que ya habían desarrollado signos clínicos de EEB (Donnelly et al., 1997; Wilesmith et al., 1997). Sin embargo, no hay evidencia clara de transmisión vertical en el ganado. Además, se demostró que los embriones no serían infecciosos incluso si se recolectaran de madres en la etapa clínica final de la EEB (Wrathall et al., 2002). De hecho, varios autores propusieron que la causa de los nuevos casos de EEB en animales nacidos tras la prohibición de alimentar a rumiantes con proteínas de origen animal era la contaminación cruzada con alimento para otros animales de producción como cerdos o aves, que legalmente podían contener harina de carne y huesos (Abrial et al., 2004; Allepuz et al., 2007; Jarrige et al., 2007; Paul et al., 2007; Pottgiesser et al., 2006; Schwermer et al., 2007; Stevenson et al., 2005).

Se investigó a la leche como fuente de PrP^{EEB} porque podría ser una ruta de transmisión entre la madre y el ternero, pero principalmente por el riesgo para los humanos relacionado con el consumo de productos lácteos. Se han realizado muchos estudios sobre este tema, pero hasta la fecha no hay evidencia de que la EEB pueda transmitirse a través de la leche o el calostro (Domingo, 2002; Everest et al., 2006; Vetrugno, 2004).

En cuanto a otras secreciones, se ha detectado PrP^{EEB} en muestras concentradas de saliva de bovinos afectados de EEB (Okada et al., 2012), aunque no se ha establecido su infectividad. Se necesitarían más estudios para ampliar el conocimiento sobre la infectividad potencial en las secreciones o excreciones de animales infectados con EEB, pero la baja incidencia actual de la enfermedad podría sugerir que la saliva no es una fuente esencial para la infección.

EEB en pequeños rumiantes

Como se ha descrito, las investigaciones sobre la EEB indicaron que la alimentación era la principal vía de transmisión de la enfermedad. Los pequeños rumiantes estuvieron expuestos al mismo alimento que el ganado bovino durante la década de 1980. Y es por esto que se llevaron a cabo algunas investigaciones para discernir la transmisibilidad de la EEB en pequeños rumiantes y determinar el riesgo de propagación. Se demostró que las ovejas y las cabras son susceptibles a la EEB por vía oral o intracraneal y también que los signos clínicos producidos por la EEB son indistinguibles de scrapie (Foster et al., 1993; Van Keulen et al., 2008). Por tanto, la posibilidad de que la PrP^{EEB} se haya transmitido a ovinos y caprinos constituiría otro riesgo potencial para la salud pública. La distribución de PrP^{EEB} en los tejidos de ovejas infectadas experimentalmente fue similar a la observada en scrapie con una amplia distribución en el tejido linfoide (Bellworthy et al., 2005; Jeffrey et al., 2001). Sería difícil de controlar si la EEB en los pequeños rumiantes se transmitiera por las mismas vías por las que se propaga scrapie. Además, los genotipos resistentes a scrapie son susceptibles de contraer EEB. Por lo tanto, los programas de selección genética aplicados en algunos países no ayudarían a prevenir la propagación de la EEB en los rebaños de ovejas (Foster et al., 1993; Jeffrey et al., 2001).

A pesar de toda esta preocupación, solo se han detectado dos casos en cabras con una enfermedad priónica natural indistinguible de la EEB en cabras infectadas experimentalmente (Eloit et al., 2005; Jeffrey et al., 2006). Por otro lado, no se ha notificado ningún caso de EEB en ovejas.

La transmisión vertical de la EEB en pequeños rumiantes se demostró en el 18 % de los corderos nacidos de ovejas infectadas experimentalmente (Jeffrey et al., 2015). La transmisión horizontal también se observó en el 0,5% de los casos, aunque este valor es inferior al esperado con scrapie. Esta transmisión deficiente probablemente se deba a la baja presencia de PrP^{EEB} en los tejidos placentarios (Jeffrey et al., 2015). A pesar de estos hallazgos, la baja transmisión observada tanto vertical como horizontalmente sugiere que es poco probable que la EEB pueda mantenerse dentro de un rebaño de ovejas.

Enfermedad desgastante crónica (EDC)

Como se mencionó anteriormente, la EDC de los cérvidos se considera una preocupación porque es capaz de mantenerse en poblaciones de animales silvestres y se ha extendido por grandes áreas.

La EDC se conoce desde finales de la década de 1960 como una enfermedad que afectaba al venado bura (*Odocoileus hemionus hemionus*) y al venado de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) en cautiverio. En 1980, la EDC se caracterizó clínica y patológicamente como una encefalopatía espongiiforme (Williams & Young, 1980). A lo largo de los años, la EDC también se describió en otras especies de cérvidos en cautiverio y en libertad, como el alce de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*), el venado de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el alce (*Alces alces*), el ciervo canadiense (*Cervus canadensis*), el ciervo rojo (*Cervus elaphus elaphus*), el ciervo sika (*Cervus nippon*) y el reno (*Rangifer tarandus*) (Benestad et al., 2016; Schwabenlander et al., 2013).

En base al conocimiento de otras enfermedades priónicas animales, se supone que la principal vía de entrada de la PrP^{EDC} es la oral. La patogenia a través de la ingestión y distribución tisular de PrP^{EDC} parece ser similar a la descrita en ovejas infectadas con scrapie. Hay una distribución temprana en el tejido linfoide, seguida de diseminación al SNC, SNP y otros órganos (Fox et al., 2006; Sigurdson et al., 1999, 2001, 2002). Pero a diferencia de lo observado en ovejas infectadas con scrapie, la acumulación de PrP^{EDC} es mayor en los ganglios linfáticos retrofaríngeos que en las placas de Peyer de ciervos infectados con EDC (Fox et al., 2006; Sigurdson et al., 1999).

De manera similar a lo que sucede scrapie, se ha observado transmisión horizontal directa o indirecta en la EDC (Miller & Williams, 2003), lo que indica que el tejido linfoide cumple un papel en la transmisibilidad de la enfermedad. En un estudio que comparó los niveles de PrP^{EDC} entre ciervos y alces afectados por EDC, la distribución de priones en los tejidos extraneurales fue menor en los alces (Race et al., 2007). Los autores sugieren que esta baja distribución periférica extraneural de PrP^{EDC} podría explicar dos situaciones: primero, la baja incidencia de EDC en alces; y segundo, transmisión horizontal insuficiente de EDC en alces en comparación con ciervos.

Se han estudiado la saliva, la orina y las heces como posibles fuentes de infección natural de EDC. La infectividad de la saliva de animales infectados se confirmó mediante su administración oral a ciervos sanos que desarrollaron EDC después de la exposición (Mathiason et al., 2006, 2009). Años más tarde, se detectó PrP^{EDC} en saliva, orina y heces de animales afectados, y se demostró su infectividad en el modelo ratón (Haley et al., 2009; Pulford et al., 2012). Además, la PrP^{EDC} podría incluso detectarse en la saliva (Henderson et al., 2013), la orina (John et al., 2013) y la materia fecal (Tamgüney et al., 2009) de animales asintomáticos. Estos hallazgos sugieren que los animales infectados pero sanos podrían ser una fuente de infección para otros

animales. Por otro lado, la detección de PrP^{EDC} en saliva, orina y heces podría utilizarse como un diagnóstico alternativo, no invasivo y preclínico de animales.

Debido a las numerosas similitudes entre la EDC y scrapie, se realizaron varios estudios para investigar la posibilidad de transmisión vertical en la EDC. La primera evidencia de transmisibilidad entre cervatillos y ciervas infectadas se realizó en el ciervo muntíaco de Reeves, una especie experimentalmente susceptible a la enfermedad, pero sin informes de transmisión natural hasta la fecha (Nalls et al., 2013). Este estudio demostró la presencia de PrP^{EDC} en tejidos fetales recolectados de ciervas preñadas enfermas. En una investigación posterior que utilizó el mismo modelo de cévido, se detectaron priones infecciosos en placentomas y líquido amniótico (Nalls et al., 2017). La acumulación de PrP^{EDC} también podría evidenciarse en el tracto reproductivo y los tejidos fetales de alces silvestres expuestos de forma natural (Selariu et al., 2015). Todos estos hallazgos sugieren que la transmisión de EDC en el útero es posible y que los fluidos y tejidos placentarios podrían ser otra fuente de contaminación ambiental.

Otras enfermedades priónicas animales

Además de las especies antes mencionadas, se han informado enfermedades priónicas en visones, félidos, varias especies de antílopes y primates no humanos (Bons et al., 1996, 1999; DEFRA, 2019; Hartsough & Burger, 1965). Se cree que estos reportes son el resultado de la ingestión de alimentos contaminados con priones de rumiantes. ETV se asoció con scrapie y, más recientemente, con L-BSE (Comoy et al., 2013; Hanson et al., 1971). Los reportes de enfermedades priónicas en félidos, primates no humanos y antílopes aparecieron a partir de 1990, principalmente en el Reino Unido durante el brote de EEB, y fueron asociados con el consumo de PrP^{EEB} (Baron et al., 1999; Eiden et al., 2010; Jeffrey et al., 1992; Kirkwood & Cunningham, 1994). De hecho, luego de que se tomaran medidas para controlar la EEB, no se reportaron más casos de enfermedades priónicas en las especies mencionadas.

Recientemente se informó una nueva enfermedad priónica en dromedarios (*Camelus dromedarius*) de Argelia, designada como enfermedad priónica del camello (EPC) (Babelhadj et al., 2018). Tres animales afectados mostraron signos neurológicos durante una inspección antemortem de rutina en un matadero. Luego, se detectó la presencia de PrP^{EPC} en tejidos nerviosos mediante inmunohistoquímica e inmunotransferencia junto con las lesiones espongiiformes características de las enfermedades priónicas. También se detectó PrP^{EPC} en los linfonódulos periféricos de uno de los animales afectados. Esto es importante ya que la distribución de priones en el tejido linfoide periférico está asociada con la transmisión horizontal en scrapie y en la EDC.

Diagnóstico de scrapie

1. Diagnóstico clínico

Las manifestaciones clínicas del scrapie clásico ocurren en promedio entre los 2 y los 5 años de edad de los animales afectados. Además de los signos clínicos producidos por cambios degenerativos en el SNC (cambios en la conducta, ataxia, posiciones anormales, temblores involuntarios), los animales afectados desarrollan prurito intenso con pérdida de lana, dermatitis por rascado y pérdida de la condición corporal que culmina en la muerte del animal (EU TSE Reference Laboratory, 2013). Por esto, entre los diagnósticos diferenciales deben descartarse parasitosis externas y otras enfermedades del SNC como la Enfermedad de Aujeszky.

En el scrapie atípico la enfermedad clínica es detectada en animales mayores a 5 años y los principales signos clínicos notificados son ataxia, cambios de comportamiento y pérdida de peso. El prurito no aparece como un signo recurrente, a diferencia de los casos de scrapie clásico (Fediaevsky et al., 2008; Konold et al., 2007).

Si bien la aparición de animales con alteraciones neurológicas y prurito son indicadores de la enfermedad, la confirmación requiere de pruebas de laboratorio que permitan detectar al agente en tejidos de los animales afectados.

2. Diagnóstico de laboratorio

La PrP^{res} puede ser detectada mediante varios procedimientos. La inmunotransferencia, ELISA y la IHQ son los métodos más utilizados en investigación y diagnóstico (Gavier-Widén et al., 2005) pero en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas, como la amplificación cíclica de malplegamiento de proteínas (*PMCA* por su nombre en inglés *protein misfolding cyclic amplification*) y la conversión inducida por agitación en tiempo real (*RT-QuIC* por su nombre en inglés *real time-quaking induced conversion*). Estas técnicas consisten en reproducir la conversión de PrP^C a PrP^{res} in vitro, utilizando la PrP^{res} presente en muestras infectadas. La *PMCA* y *RT-QuIC* permitieron un avance en el conocimiento de las enfermedades priónicas ya que tienen una mayor sensibilidad que otros métodos (Eraña et al., 2020) pero no son utilizados como técnicas diagnósticas de rutina.

El diagnóstico de esta enfermedad se basa en la detección postmortem de la PrP^{Sc} en tejido del SNC. Las técnicas aprobadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) son la inmunohistoquímica, la inmunotransferencia o Western blot (WB), y las pruebas rápidas (OMSA, 2022). La histopatología fue la prueba diagnóstica utilizada desde la descripción de la enfermedad, sin embargo, fue perdiendo relevancia en el siglo XXI debido al desarrollo de técnicas más sensibles y específicas.

En el caso de scrapie, debido a la acumulación temprana de PrP^{Sc} en órganos linfoides, pueden implementarse pruebas antemortem incluso preclínicas. Para esto se utilizan muestras de tejido linfoide de fácil acceso. Los más utilizados son el tejido linfoide asociado a mucosas del recto (Espenes et al., 2006) y el tercer párpado (O'Rourke et al., 2000) pero también pueden utilizarse las tonsilas (Schleuder et al., 1998). Estas técnicas son implementadas por algunos países como Estados Unidos o Canadá en sus programas de control y erradicación de la enfermedad (Animal and Plant Health Inspection Service, 2022; Canadian Food Inspection Agency, 2023a).

Muestras para pruebas postmortem

Una muestra del bulbo raquídeo a nivel del óbex es la más apropiada para el diagnóstico del scrapie clásico ya que es el primer sitio en el que se observan alteraciones morfológicas (OMSA, 2022). En cuanto al scrapie atípico la distribución es diferente, siendo el cerebelo, el tálamo, sustancia *nigra* y los ganglios basales las zonas más afectadas (Moore et al., 2008). Por lo tanto, para cubrir el diagnóstico de las dos formas conocidas de la enfermedad, la OMSA establece que el bulbo raquídeo y el cerebelo son las principales zonas que deben muestrearse (OMSA, 2022).

La toma de muestra puede realizarse a través del foramen magno con la ayuda de cucharas especiales diseñadas para este fin o a través de la apertura del cráneo. En el caso de la vigilancia epidemiológica con estas dos muestras alcanzan, pero si el animal fuera sospechoso de estar infectado sería necesario el análisis del encéfalo completo (OMSA, 2022).

Histopatología

Utilizada para diagnóstico de EETs durante largo tiempo mediante la detección del cambio esponjiforme del SNC, la histopatología no es recomendada actualmente para el diagnóstico de estas enfermedades (OMSA, 2022). La utilización de técnicas que utilizan anticuerpos específicos para la detección de PrP^{res} aumentó la sensibilidad del diagnóstico. Esto se debe a que la acumulación de PrP^{res} en los tejidos ocurre antes de la aparición de lesiones y signos clínicos (Jeffrey & González, 2004) por lo que hace que esta técnica no sea adecuada para demostrar la ausencia de infección en una población (OMSA, 2022).

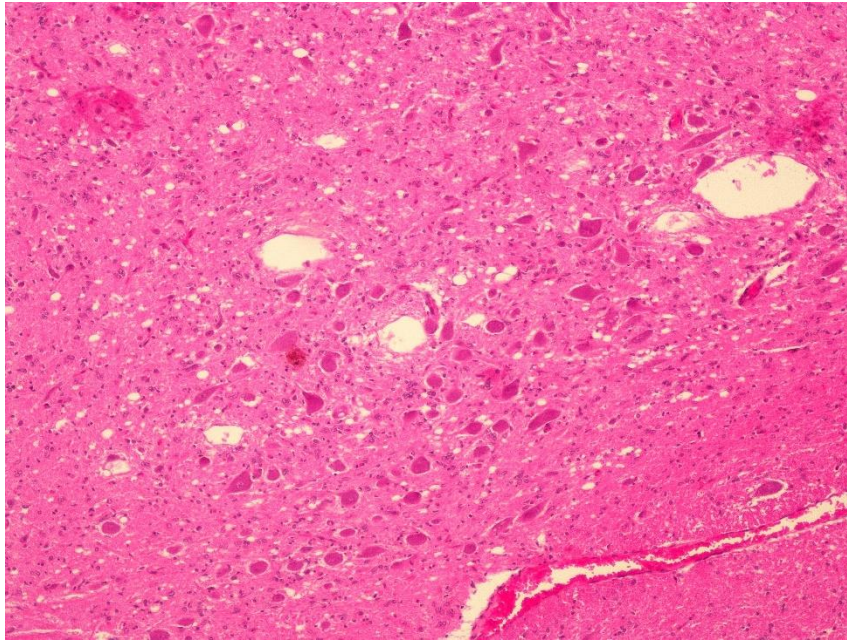


Figura 2. Vacuolización del neuropilo en el NDVD, SNC de un ovino afectado con scrapie, hematoxilina y eosina, 10X.

La típica lesión histopatológica de las EETs es la degeneración esponjiforme de la sustancia gris sin cambios inflamatorios. Esta lesión consiste en la vacuolización bilateral y simétrica de las neuronas y del neuropilo circundante acompañada de una gliosis variable (figura 2). Si bien en casos avanzados la afección del encéfalo es generalizada, la región inicialmente afectada es el tronco encefálico, especialmente los *sitios blanco*. La vacuolización en un solo *sitio blanco* es suficiente para una confirmación histopatológica (APHA, 2019), sin embargo, la ausencia de lesión en caso de sospecha clínica no podría descartar la infección. Los *sitios blanco* comunes en ovinos con scrapie y los bovinos con EEB son el núcleo del tracto solitario, el NDNV y el núcleo del tracto trigeminal. En los casos de scrapie atípico la vacuolización, si es que la hay, se limita a la corteza cerebelar, la corteza cerebral y los ganglios basales (Benestad et al., 2008).

Detección de PrP^{res} mediante IHQ

La técnica de IHQ puede detectar la PrP^{res} *in situ* a través de anticuerpos específicos revelados por un sistema cromogénico. Por lo general la inmunomarcación ocurre en las mismas regiones descritas para las lesiones histopatológicas, aunque, como ya se mencionó, puede haber inmunomarcación sin asociación a lesión (Jeffrey & González, 2004).

Esta técnica se basa en una reacción antígeno-anticuerpo en donde el antígeno se encuentra en secciones de tejido fijadas en formol al 10%, una solución fijadora que produce enlaces cruzados. Este entrecruzamiento entre los antígenos y otras proteínas puede reducir o bloquear la inmunoreactividad ya que se modifica la estructura tridimensional (estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas) (Ramos-Vara & Miller, 2014). Es por esto que es necesario un

proceso de recuperación antigénica cuando las muestras fueron fijadas en formol, de manera de revertir sus efectos. Este proceso puede ser físico (calor, ultrasonido) o químico (digestión enzimática, desnaturizantes) siendo los métodos más utilizados aquellos que utilizan enzimas (PK, tripsina, etc.) y aquellos que utilizan calor húmedo (autoclave, microondas, etc.). En el caso del diagnóstico de scrapie se utiliza la combinación de ácido fórmico como agente desnaturizante y calor húmedo.

Para el reconocimiento de la PrP^{Sc} se utilizan anticuerpos monoclonales que luego son reconocidos por un sistema de revelado. Estos sistemas se basan en la identificación del anticuerpo primario a través de una reacción cromógena. Suelen utilizarse anticuerpos que reconocen epítopes de la fracción constante del anticuerpo primario utilizado (anti-ratón, anti-conejo, etc.). Estos anticuerpos secundarios están conjugados con moléculas que permiten la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo. Las moléculas más comunes son enzimas como la peroxidasa del rábano (HRP del inglés *horseradish peroxidase*) o la fosfatasa alcalina. Estas enzimas en presencia de un sustrato cromógeno producen un precipitado coloreado revelando el sitio de la reacción antígeno-anticuerpo. Otro sistema de detección muy utilizado es el basado en estructuras poliméricas más complejas. Dichos sistemas constan de un polímero de dextrano marcado con peroxidasa y conjugado con inmunoglobulinas anti-ratón y anti-conejo. Posee una gran sensibilidad ya que cada complejo contiene numerosas moléculas de enzima que amplifica la inmunomarcación.

El sustrato precipitado puede presentar distintos aspectos dependiendo de su localización anatómica y celular. El laboratorio de referencia de las EET animales (*Animal and Plant Health Agency*) se basó en las observaciones de Spiropoulos et al. (2007) para establecer los diferentes patrones de inmunomarcación posibles en tejido nervioso de pequeños rumiantes con scrapie (APHA, 2019) (ver figuras 3 y 4).

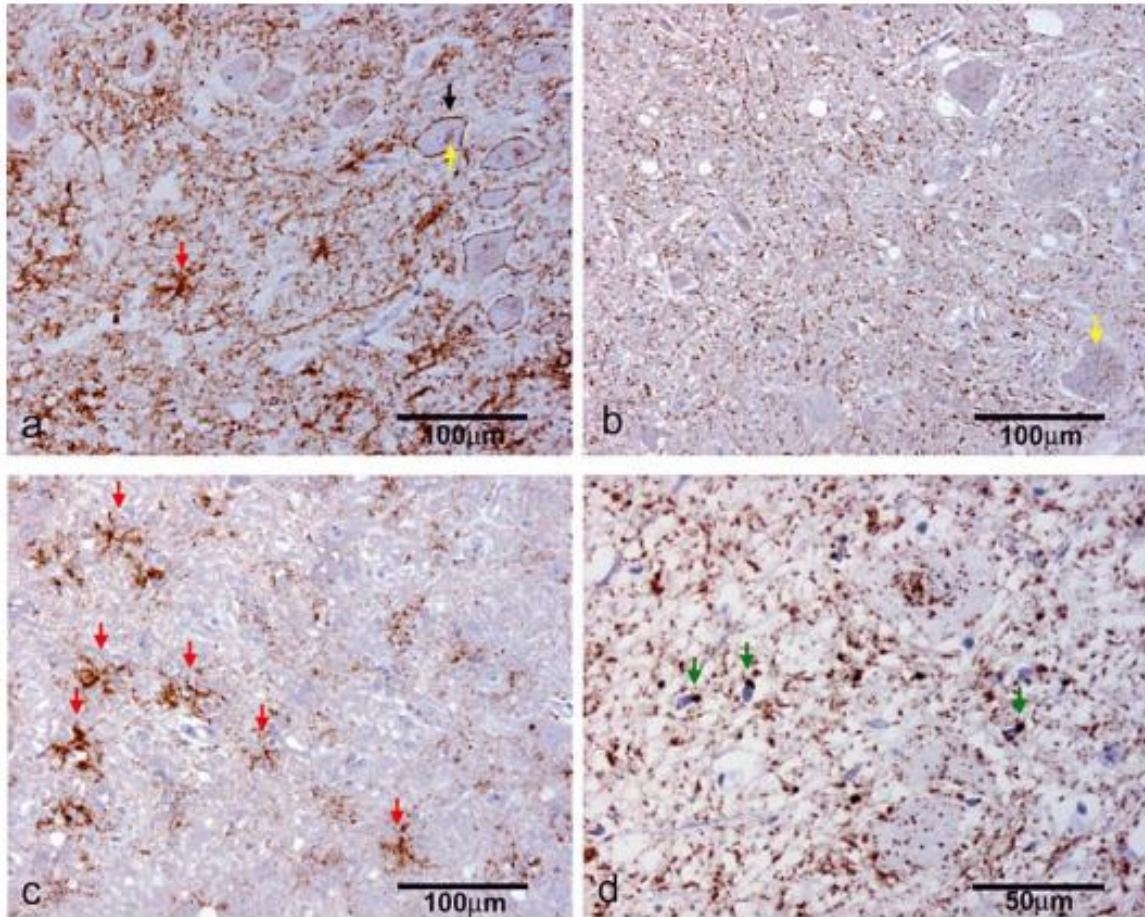


Figura 3. Patrones inmunohistoquímicos en la detección de PrP^{Sc} en pequeños rumiantes con scrapie (APHA, 2019; Spiropoulos et al., 2007). En la imagen (a) se observan depósitos granulares de PrP^{Sc} generalizados en el neuropilo. También se observa depósitos gliales (flecha roja), intraneuronales (flecha amarilla) y perineuronales (flecha negra). En la imagen (b) se observan depósitos punteados generalizados de PrP^{Sc} en el neuropilo. También se observan depósitos intraneuronales (flecha amarilla). En la imagen (c) se observan depósitos gliales (flechas rojas) que dan la impresión de ramificaciones. En la imagen (d) se observan depósitos intragiales (flechas verdes) que aparecen pequeños, bien definidos, densos y de forma globular en la cercanía de los núcleos de las células gliales.

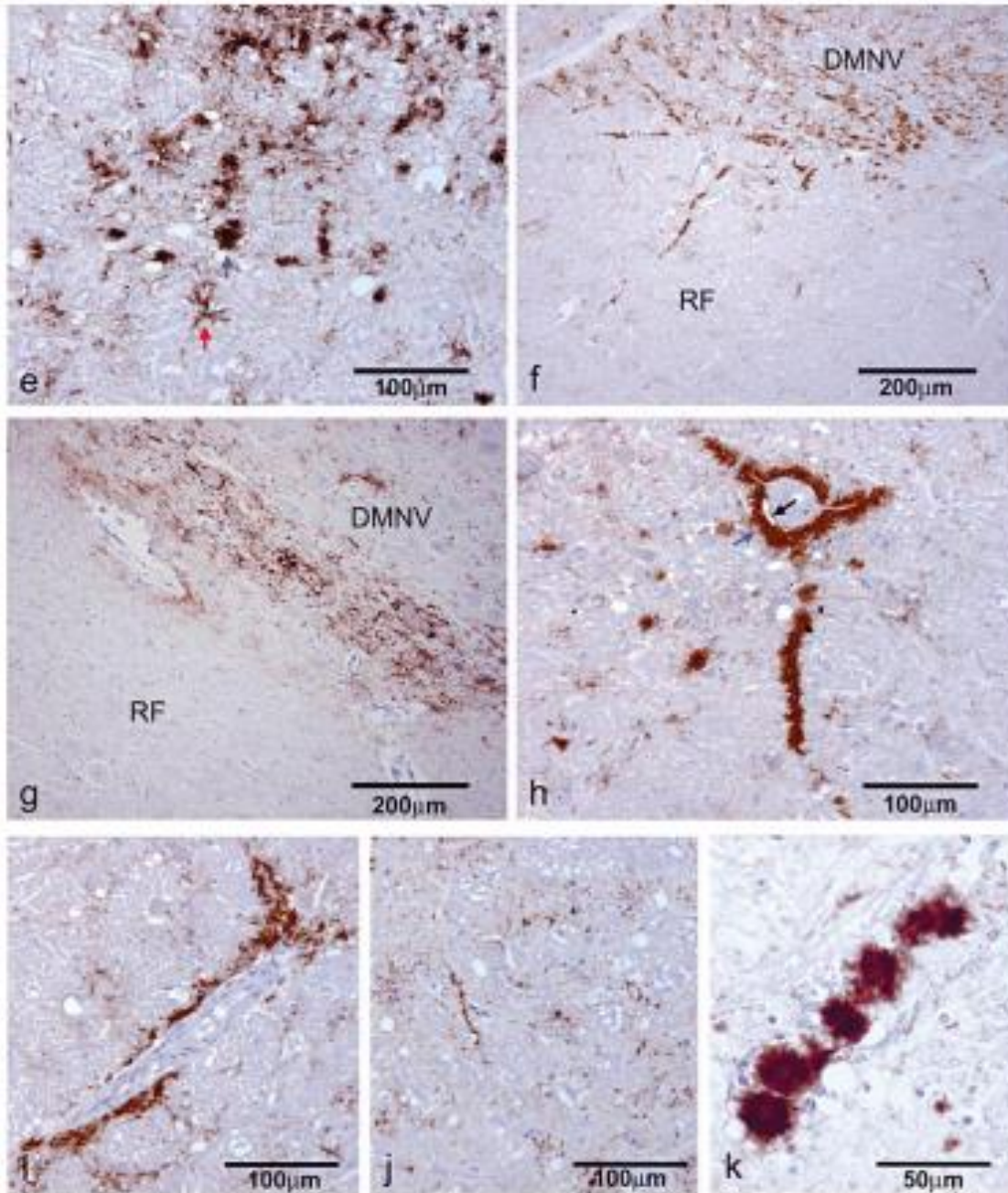


Figura 4. Patrones inmunohistoquímicos en la detección de PrP^{Sc} en pequeños rumiantes con scrapie (APHA, 2019; Spiropoulos et al., 2007). En la imagen (e) se observan depósitos coalescentes (flecha azul) de forma amorfa. También están presentes depósitos gliales (flecha roja) y granulares. En la imagen (f) a menor aumento se muestra la distribución de los depósitos coalescentes en el borde DMNV. En la imagen (g) se ven depósitos coalescentes (y granulares). En la imagen (h) depósitos coalescentes perineuronales. En la imagen (i) los depósitos son perivasculariales. En la imagen (j) son lineales y en la imagen (k) en forma de placa.

Inmunotransferencia o Western blot (WB)

La inmunotransferencia o Western blot (WB) es una técnica de detección específica de proteínas a través de anticuerpos. Las proteínas previamente son separadas en un proceso de electroforesis y luego transferidas a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF) donde quedan inmovilizadas para luego ser enfrentadas a los anticuerpos específicos.

La muestra en este caso es el tejido nervioso de las zonas ya mencionadas que es sometido a detergentes como el sarkosyl (lauroil sarcosinato de sodio) para extraer la PrP (Stack, 2004). Tanto la PrP^C como la PrP^{Sc} poseen una masa molecular de 33-35 kDa (Meyer et al., 1986) pero la PrP^C es totalmente digerida por la PK mientras que la PrP^{Sc} no. Solo la porción N-terminal es degradada dejando un fragmento de 27-30 kDa en el caso de scrapie clásico (Madec et al., 1998). Basándose en esta característica del agente, se somete la muestra a la acción de la PK para eliminar la presencia de la PrP^C evitando que los anticuerpos anti-PrP^{Sc} reconozcan también la PrP^C (OMSA, 2022; Stack, 2004).

Esta técnica además permite diferenciar entre ambas formas de la enfermedad. En el caso del scrapie atípico se observan múltiples fragmentos (de 11 a 31 kDa) luego de la digestión con PK (Benestad et al., 2008) debido a que la PrP^{Sc} aislada de animales afectados con la forma atípica es menos resistente a la PK que la PrP^{Sc} aislada de animales con la forma clásica (Buschmann et al., 2004).

Pruebas rápidas

Debido a la necesidad de identificar rápidamente animales infectados (por necesidad de determinar su destino para consumo humano o para evaluar gran número de animales en períodos cortos) se desarrollaron kits o sistemas diagnósticos denominados rápidos. Los mismos, basados en metodología de ELISA, WB e incluso inmunoensayos de flujo lateral, se utilizaron ampliamente a lo largo de la epidemia de EEB. Se desarrollaron productos también para diagnóstico de scrapie, aunque su difusión fue mucho menor. Actualmente existen en el mercado unas pocas pruebas rápidas para el diagnóstico de EEB y scrapie a partir de muestras frescas de SNC. Son *kits* comerciales de ELISA desarrollados por dos empresas (Bio-Rad e Idexx). Estas pruebas actualmente son muy utilizadas para hacer un *screening* en los sistemas de vigilancia epidemiológica debiendo confirmar los resultados positivos o no-concluyentes con técnicas confirmatorias (WB comerciales o desarrollados *in house*, o IHQ) (Groschup & Langeveld, 2019).

Diagnóstico preclínico de scrapie

Como se mencionó anteriormente, las muestras más utilizadas para este tipo de diagnóstico son la mucosa del tercer párpado y la rectal. Las biopsias de tonsila contienen un mayor número de folículos linfoides pero su extracción es más dificultosa (O'Rourke et al., 2000). Sin

embargo, ha sido propuesta como una muestra complementaria a tomar en frigoríficos ya que en algunos casos se ha detectado PrP^{Sc} en tonsilas de animales negativos al diagnóstico de EET en tejido nervioso (Konold et al., 2020).

El tercer párpado, también conocido como membrana nictitante, es un pliegue de conjuntiva semilunar presente en los rumiantes y otras especies de animales (Schlegel et al., 2001). Se encuentra entre la córnea y el párpado inferior en medial del canto del ojo y tiene una superficie bulbar adyacente al ojo y otra superficie palpebral en contacto con el párpado inferior (figura 5). Además, posee un cartílago en forma de "T" que le aporta estructura. En la superficie bulbar pueden observarse dos protuberancias a los costados de la línea media que corresponden al tejido linfoide asociado a la conjuntiva que debe muestrearse para el diagnóstico de scrapie (O'Rourke, Baszler, Parish, et al., 1998; O'Rourke et al., 2000, 2002). Sin embargo, las elevaciones no siempre están presentes y otros autores propusieron que protuberancias presentes en la superficie palpebral sean el sitio adecuado a muestrear (Thuring et al., 2000).

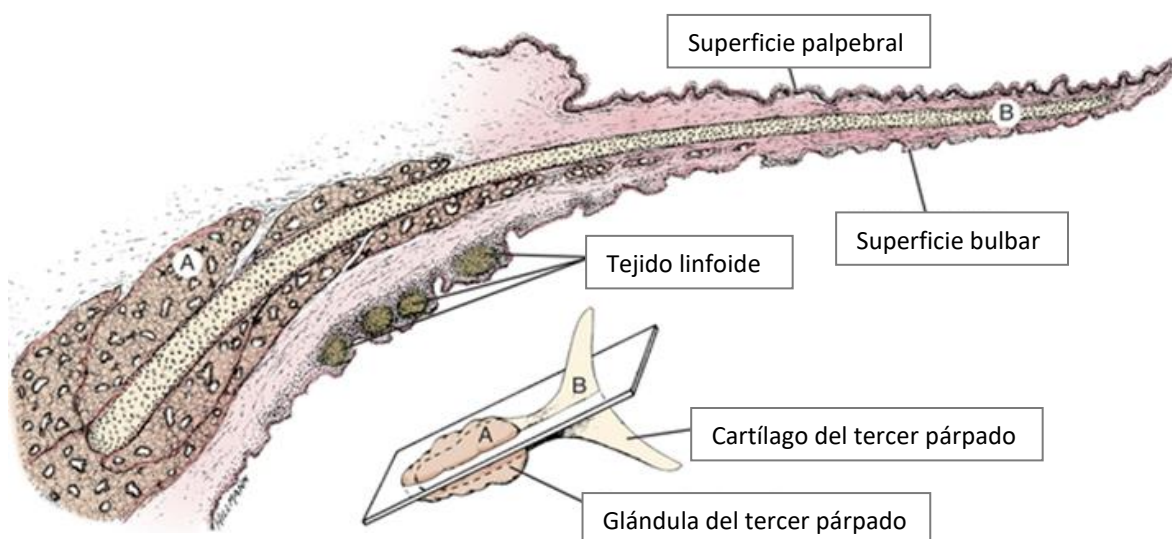


Figura 5. Sección transversal de tercer párpado. A: glándula del tercer párpado; B: cartílago del tercer párpado. Modificado de Evans y Miller (2016).

La mucosa rectal es asiento de tejido linfoide en diferentes especies. Su uso para diagnóstico de scrapie se basa en la presencia de acúmulos de folículos linfoides en forma de anillo cercanos a la línea recto-anal. Espenes et al. (2006) se basó en descripciones hechas por Aleksandersen et al. (1991) para indicar que la muestra adecuada debe tomarse aproximadamente a 2-3 cm craneal a la línea recto-anal. Sin embargo, otros autores señalan que la muestra ideal debe tomarse de 0 a 1 cm a partir del inicio de la intersección mucocutánea (González et al., 2006; Keane et al., 2009). Estas diferencias de criterio limitarían la utilidad de la muestra para detección de PrP^{Sc} ya que el agente se ubica en folículos linfoides y su ausencia resta relevancia al ensayo.

Otro aspecto a considerar al momento de definir la aptitud diagnóstica de las muestras de mucosa es la cantidad de folículos linfoides presentes. Mientras que algunos autores consideran necesaria la presencia de 6 o más folículos linfoides en la muestra para ser apta para el diagnóstico (O'Rourke et al., 2002), otros opinan que la presencia de un solo folículo es suficiente (Monleón et al., 2011).

Situación regional y nacional

No se han registrado en Argentina ninguna EET animal. Desde 1989 se desarrollan actividades vinculadas a estas enfermedades siendo el primer país de la región en abordar la temática. De esta manera, instituciones públicas y privadas realizaron actividades de investigación, capacitación y difusión a profesionales y productores destacándose el accionar del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), el cual desarrolló un laboratorio de diagnóstico para estas enfermedades, realizó actividades de vigilancia epidemiológica a través de su red de laboratorios de salud animal (Blanco Viera et al., 1998), y participó de la redacción del análisis de riesgo de EEB en Argentina (Schudel et al., 1996). En 2002 se crea el Programa de Prevención y Vigilancia de las EET de los animales, con los objetivos de mantener la mejor condición sanitaria de Argentina para EEB y otras EET de los animales y certificar la condición sanitaria del país respecto de estas enfermedades en productos derivados destinados al consumo interno y a la exportación (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2002). Dicho programa reconoce al laboratorio de INTA como Laboratorio Nacional de Referencia, el cual debido a su accionar a nivel regional fue designado como Laboratorio de referencia de la OMSA para EEB y Scrapie durante el período 2009-2018.

Entre los componentes principales del programa se encuentran la prevención del agente al país desde el exterior mediante el control de importaciones de animales y material de riesgo, la prevención de la amplificación del agente mediante la prohibición de la alimentación de ruminantes con proteína de origen animal (salvo excepciones), y el sostenimiento de un sistema de vigilancia capaz de detectar la aparición de casos.

El control de importaciones se basa en la regulación de las importaciones de mercancías de animales vivos, material reproductivo y derivados de origen animal (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2015) pero también en el registro y seguimiento de reproductores ruminantes importados (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2019b). A su vez, en la Argentina está prohibido ingresar alimentos que contengan como ingredientes carnes, menudencias, vísceras, productos, subproductos y derivados de origen animal rumiante de determinados países (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2001). Además, existe una regulación en cuanto a alimentos importados para consumo humano o animal provenientes de ciertos países que deben ser analizados antes de su despacho a plaza.

Para evitar el reciclado y amplificación del agente (PrP^{Sc}) existen medidas de prevención en la producción, comercialización y transporte de harinas de carne y hueso animales como la eliminación de materiales de riesgo de difusión de las EET (cerebro, cerebelo y médula) o el análisis para corroborar ausencia de proteínas animales en la producción de cenizas de hueso. También existen restricciones en la producción, comercialización, transporte y utilización de alimentos para ruminantes. En Argentina está prohibido alimentar a los mismos con proteínas de origen animal o cama de pollo. Los establecimientos que producen alimentos para animales

deben estar registrados y habilitados y aquellos que producen alimento para rumiantes y para no rumiantes deben tener producciones separadas (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2015).

El sistema de vigilancia se divide en una vigilancia pasiva y una activa. La vigilancia pasiva de la enfermedad consiste en la realización de las pruebas diagnósticas ante la notificación al SENASA de un animal con cuadro neurológico compatible con EEB o scrapie. Esta notificación puede ser realizada por el productor, encargado, responsable de los animales, veterinario privado a cargo del predio o laboratorio de diagnóstico. Al desarrollarse normalmente en áreas rurales, la notificación sucede ante una oficina local del SENASA, cuyo veterinario oficial deberá atender a nivel de campo y accionar en forma inmediata. Deberá definir clínicamente al animal como: animal blanco, sospechoso u otra patología pudiendo dejar en observación al animal, a fin de ver su evolución o respuesta a determinados tratamientos. En el caso de arribar al concepto de sospecha se realiza la toma de muestra para el diagnóstico de EET (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2003).

En cambio, la vigilancia activa se basa en la búsqueda de la enfermedad, mediante un diseño de muestreo estadístico de determinadas subpoblaciones de animales en riesgo. Incluye todas las acciones que impliquen controles y seguimientos continuos y programados, como así también aquellos circunstanciales, por parte de los organismos sanitarios oficiales correspondientes (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2003):

- El seguimiento, ya mencionado, de reproductores rumiantes importados pertenecientes a las especies susceptibles.
- Inspección clínica de animales en predios por diversas causas o en forma concomitante con otras acciones (campañas de vacunación, despacho de tropas de zona de garrapatas, control de cuarentenas de importaciones y/o exportaciones, etc.).
- Inspección clínica (antemortem) en frigoríficos.
- Inspección clínica en concentraciones de hacienda (Mercados Concentradores, Remates ferias y Exposiciones).
- Monitoreo continuo a través del análisis de muestras encefálicas extraídas de frigoríficos y de otras fuentes, de animales con sintomatología neurológica o de aquellos que respondan a la definición de animal blanco.

El diseño de muestreo está basado en las recomendaciones de la OMSA que especifica estrategias diferentes dependiendo del estatus sanitario del país en cuestión. En nuestro caso, al tener un estatus de “riesgo insignificante”, se aplica un tipo de vigilancia activa destinada a detectar al menos un caso de EEB si la prevalencia estimada es mayor a un caso sobre 50.000, con un nivel de confianza del 95%. Se utiliza un sistema de valoración por puntos, otorgándole un valor a cada individuo diagnosticado como negativo según la tabla 2 (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022). Para alcanzar el objetivo de este tipo de vigilancia se deben alcanzar 150.000 puntos en 7 años o menos.

Subpoblación vigilada			
Sacrificio de rutina ¹	Animales fallecidos ²	Sacrificio de emergencia ³	Sospecha clínica ⁴
Edad > 1 año y < 2 años			
0.01	0.2	0.4	N/A
Edad ≥ 2 años y < 4 años (adulto joven)			
0.1	0.2	0.4	260
Edad ≥ 4 años y < 7 años (adulto medio)			
0.2	0.9	1.6	750
Edad ≥ 7 años y < 9 años (adulto mayor)			
0.1	0.4	0.7	220
Edad ≥ 9 años (animal viejo)			
0.0	0.1	0.2	45

Tabla 2. Valores en puntos de las muestras para la vigilancia de EEB tomadas de animales de una subpoblación y un grupo de edad determinados (Organización Mundial de Sanidad Animal, 2022).

El último punto del Programa de Prevención y Vigilancia de las EET es la generación de un sistema de difusión, capacitación y educación continua. Desde 1992 se lleva a cabo un Programa de capacitación continua con alcance a todo el país, dirigida tanto a agentes de SENASA como a personas vinculadas a la sanidad animal y la salud humana.

Como resultado del programa y de medidas ejecutadas con anterioridad, la Argentina ha mantenido siempre la máxima categoría sanitaria para EEB, siendo uno de los pocos países del mundo que ha mantenido esta condición desde la existencia de la enfermedad.

La situación en otros países de América es diferente. Por ejemplo, en América del Norte, scrapie ha estado presente desde hace varias décadas. Primero se reportó en Canadá, en 1938 (Canadian Food Inspection Agency, 2022) y luego en los Estados Unidos en 1947 (United States Department of Agriculture, 2022). En estos países existen programas nacionales que apuntan a la erradicación de scrapie a través de una vigilancia destinada a identificar los rebaños infectados e implementar acciones de control de la enfermedad en establecimientos donde se identifique scrapie. El diagnóstico a partir de tejido linfoide de tercer párpado o mucosa rectal son considerados dentro de estos programas para confirmar casos e incluso, dentro del programa de Estados Unidos, la técnica de IHC en óbex o tejido linfoide es considerada como prueba *gold standard* (Animal and Plant Health Inspection Service, 2022; Canadian Food Inspection Agency, 2023a). A pesar de los programas de control implementados desde hace años en Estados Unidos y Canadá, scrapie aún está presente en estas regiones (Animal and Plant Health Inspection Service, 2023; Canadian Food Inspection Agency, 2023b).

En cuanto a América Latina existen pocos reportes de scrapie clásico hasta el momento, limitándose los mismos a Brasil. El primer caso de scrapie clásico en Brasil fue diagnosticado en

1978 y luego se notificaron 16 casos en ovinos y un caso en un caprino entre 1978 y 2010 (de Andrade et al., 2015; Leal et al., 2015). En los brotes descriptos solo 4/22 individuos dieron positivo a las técnicas a partir del tejido nervioso, todos ellos con signología nerviosa. El resto (18/22), fueron detectados como infectados a partir de muestras de tejido linfoide asociado a mucosa de tercer párpado o rectal. Esto remarca la importancia del diagnóstico de scrapie a partir de tejido linfoide ya que ninguno de esos animales presentaba signos clínicos a pesar de estar infectados.

La presencia de scrapie en países limítrofes representaría un riesgo para el ingreso de la enfermedad a la Argentina. Uno de los brotes de scrapie en Brasil ocurrió en el estado de Paraná, limítrofe con la provincia de Misiones, Argentina, (Leal et al., 2015). Los individuos afectados en estos casos fueron de las razas Dorper y Santa Inés, dos razas que se crían actualmente en Misiones (Ministerio del Agro y la Producción de la Provincia de Misiones, 2020) cuyo origen sea posiblemente Brasil. Aspectos como estos deberían tenerse en cuenta en la vigilancia de scrapie en nuestro país.

Como se comentó previamente, nuestro país cuenta desde 2002 con un Programa de Prevención y Vigilancia de las EET, el cual no ha detectado casos de ninguna EET en animales (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2023). Si bien el principal foco del programa se hace en EEB, el mismo incluye a los ovinos y caprinos. De esta manera, no existe un programa de prevención y control específico para scrapie, sino que se incluye a pequeños rumiantes entre las especies involucradas en la vigilancia. En este sentido, ovinos y caprinos son anualmente evaluados para scrapie, y el ingreso de animales vivos y alimentos o productos de origen ovino y caprino se encuentra oficialmente regulado, debiendo cumplirse una serie de requisitos específicos para su importación.

El diagnóstico de scrapie mediante estudios del tejido linfoide es utilizado ampliamente en diferentes países. Sin embargo, no se ha estudiado si existen cambios a lo largo de la vida de los animales. A su vez, no existen registros de su composición en animales de Argentina. Así, conocer características propias del tejido linfoide de mucosas de ovinos y caprinos de Argentina podría ser ventajoso al momento de evaluar su utilidad en programas de control y/o erradicación de la enfermedad.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

Existen cambios en la proporción de tejido linfoide en las mucosas palpebral y rectal de los ovinos y caprinos de acuerdo a su edad, que podrían afectar el resultado de las pruebas utilizadas para diagnóstico preclínico de scrapie o prurigo lumbar.

Objetivo General:

Determinar si existen variaciones en el tejido linfoide asociado a mucosas de fácil acceso de ovinos y caprinos en relación a su edad y obtener herramientas para el diagnóstico de scrapie.

Objetivo Específico 1:

Caracterizar la dinámica y los componentes celulares del tejido linfoide presente en las mucosas del tercer párpado y recto en ovinos y caprinos de las provincias de Buenos Aires y Salta.

Objetivo Específico 2:

Producir anticuerpos de yema de huevo (IgY) capaces de reconocer PrP^C y proteína priónica anómala (PrP^{Sc}).

Objetivo Específico 3:

Desarrollar y/u optimizar técnicas de laboratorio (IHQ y/o *inmunotransferencia*) capaces de reconocer PrP^C y PrP^{Sc}.

Capítulo 2

Caracterización del tejido linfoide asociado a mucosas de ovinos y caprinos de Buenos Aires y Salta

Una de las particularidades que tiene scrapie en comparación con otras EET animales es la posibilidad de realizar un diagnóstico preclínico de la misma. Este, realizado *in vivo*, tendría la ventaja de detectar animales infectados que diseminarian el agente en el ambiente. Esto es de importancia al momento de ingresar animales a un establecimiento/región libre de scrapie de manera de reducir el riesgo de aparición de la enfermedad. Para ello es determinante la diseminación temprana del agente en tejido linfoide, lo cual permite su detección en el mismo. Debido a su fácil acceso, se utiliza el tejido linfoide asociado a mucosas (TLAM), habiéndose demostrado la utilidad del tejido linfoide de las mucosas palpebral y rectal (González et al., 2006; O'Rourke et al., 2000).

El TLAM cumple un rol inmunitario importante, desarrollando una respuesta en el sitio de exposición a patógenos. Está involucrado en la captación de antígenos de las superficies luminales, estimulación de linfocitos y migración de células a linfonódulos regionales u otros órganos. Está presente en diversas regiones anatómicas tomando diferentes nombres como, por ejemplo:

- Tejido linfoide asociado a la conjuntiva (TLAC)
- Tejido linfoide asociado a la nasofaringe (TLAN)
- Tejido linfoide asociado a los bronquios (TLAB)
- Tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (TLAM gástrico)
- Tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (TLAG)

Estructuralmente, el TLAM debe tener ciertas características para ser considerado como tal (Brandtzaeg & Pabst, 2004; Liebler-Tenorio & Pabst, 2006). Así, debe mantener estrecho contacto con la superficie de una mucosa y estar organizado en folículos linfoides y áreas interfoliculares. Los folículos corresponden al tejido linfoide organizado en forma nodular y están predominantemente formados por linfocitos B dentro de una matriz de CDF, con cantidades menores de linfocitos T y macrófagos. Los folículos pueden ser primarios (sin centro germinativo) o secundarios (con centro germinativo). A diferencia de los folículos, las áreas interfoliculares contienen predominantemente linfocitos T.

El TLAM puede estar constituido como folículos linfoides únicos (aislados) o como agregados más grandes de varios folículos. El epitelio que recubre los folículos linfoides del TLAM se denomina epitelio asociado a folículos (EAF) (J. I. Park et al., 2023; Steven & Gebert, 2009). El mismo se caracteriza por carecer de células caliciformes y por poseer células morfológicamente distintas especializadas en la captación de antígenos denominadas células M en función de su morfología (Steven & Gebert, 2009). "M" es la abreviatura de célula "portadora de micropliegues". La captación de antígenos se produce a través del EAF por células M o células dendríticas. La poca cantidad o ausencia de células caliciformes genera que en EAF la capa de

mucus sea más delgada lo que permite que los antígenos presentes en el lumen accedan fácilmente a la superficie del EAF y puedan ser captados (Nakamura et al., 2018). La recirculación de los linfocitos ocurre a través de vénulas de endotelio alto presentes en las zonas interfoliculares.

El tejido linfoide asociado a la mucosa del tercer párpado pertenece al denominado tejido linfoide asociado a conjuntiva (TLAC). Si bien comparte todas las características mencionadas para el TLAM, existen controversias sobre la presencia de células M en el EAF del TLAC. Algunos autores notificaron la ausencia de células con morfología compatible a las células M en diversas especies de mamíferos (Chodosh et al., 1998; Steven & Gebert, 2009). Sin embargo, otros autores encontraron células morfológicamente similares a las células M en perros y gatos a través de análisis por microscopía electrónica (Giuliano et al., 2002; Giuliano & Finn, 2011) o células con capacidad de captar macromoléculas en cabras (Aşti et al., 2000). En cuanto a la caracterización inmunohistoquímica de TLAC, existen pocos estudios en animales.

El otro tipo de TLAM estudiado en este trabajo es el tejido linfoide asociado a la mucosa rectal que es parte del TLAG y forma un anillo hacia el final del recto cercano a la línea recto-anal (Aleksandersen et al., 1991). Las caracterizaciones inmunohistoquímicas de las poblaciones celulares hechas en ovinos y cérvidos concuerdan con lo descrito en otros TLAM. Los linfocitos B predominan en los folículos linfoides mientras que los Linfocitos T lo hacen en las zonas perifoliculares (Dagleish et al., 2012; Sedgmen et al., 2002).

El fundamento del diagnóstico de scrapie en tejido linfoide radica en la presencia de PrP^{Sc} en células presentes en este tipo de tejidos, fundamentalmente en CDF. Estas están ubicadas en los folículos linfoides, formando una red de prolongaciones con la función de presentar antígenos a los linfocitos participando en su activación y manteniendo la arquitectura de los folículos (Rezk et al., 2013). Esta retención y presentación de antígenos lo hacen en ausencia de moléculas del complejo de histocompatibilidad clase II por eso no son consideradas células presentadoras de antígenos (CPA) siguiendo la definición clásica. Presentan complejos antígeno-anticuerpo intactos en su superficie celular a través de receptores Fc como CD32 y CD23, o los receptores de complemento, como CD21 y CD35 (C. S. Park & Choi, 2005). La presencia de CDF es por tanto clave para el diagnóstico, ya que al no estar presentes podría no detectarse PrP^{Sc}, y por tanto concluirse un diagnóstico negativo erróneo.

Existe un único reporte que evalúa la presencia de PrP^C en el tejido linfoide de mucosas de fácil acceso en ovinos de Argentina (Capellino, 2010) pero no hay datos en caprinos. El objetivo del presente capítulo es evaluar la aptitud diagnóstica y caracterizar los componentes celulares del TL presente en las mucosas del tercer párpado y recto en ovinos y caprinos de las provincias de Buenos Aires y Salta.

Materiales y Métodos

Animales evaluados

Para determinar el número de animales a muestrear se utilizó el *software ProMESA* para un muestreo estratificado. Se tuvo en cuenta que la población de pequeños rumiantes en Argentina en el 2016-2017 era de 14.864.321 ovinos (5.870.781 menores de 18 meses aproximadamente y 8.993.540 mayores) y 4.863.894 caprinos (1.368.344 menores de 18 meses aproximadamente y 3.495.550 mayores) (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2016, 2017). Se consideraron los resultados de Monleón et al. (2011) que indican que el 98,5% de los ovinos y el 87,5% de los caprinos poseen al menos un folículo linfoide en las mucosas a muestrear. Por consiguiente, para estimar la presencia del tejido linfoide en las mucosas de interés -con una confianza del 95%- se deberían coleccionar aleatoriamente muestras de 25 ovinos (15 adultos y 10 menores de 18 meses) y 56 caprinos (40 adultos y 16 menores de 18 meses). Las salidas del programa se encuentran en el anexo de esta tesis.

Se analizaron 66 ovinos de la provincia de Buenos Aires (36 menores de 18 meses y 30 mayores), y 54 caprinos totales (3 de la provincia de Bs. As. y 51 de la de la provincia de Salta) (51 menores y 3 mayores) (ver tabla 3). Se obtuvieron muestras de tejido postmortem, durante la faena en frigorífico o tras realización de necropsia. La edad de los animales se estimó mediante cronología dentaria tomando como referencia lo establecido por Pugh y Baird (2012): aquellos animales con segundos incisivos permanentes fueron considerados mayores de 18 meses ya que erupcionan entre los 18 y 24 meses. Se consideró 18 meses como edad límite para categorizar los animales debido a que es la edad que establece el programa de vigilancia de EET en Argentina a partir de la cual se deben testear los pequeños rumiantes (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, 2019a). Los programas de otros países establecen límites de edad diferentes, aunque generalmente menores. El de Canadá, por ejemplo, establece que el diagnóstico mediante muestras de mucosa de tercer párpado y mucosa rectal puede realizarse a partir de los 14 y 12 meses respectivamente (Canadian Food Inspection Agency, 2023a).

	<i>Menores de 18 meses</i> <i>(Grupo J)</i>	<i>Mayores de 18 meses</i> <i>(Grupo G)</i>
<i>Ovinos</i>	36	30
<i>Caprinos</i>	51	3

Tabla 3. Individuos muestreados categorizados según especie y edad.

Muestras a analizar

Se tomaron muestras postmortem, una vez que los animales fueran sacrificados durante la faena (frigorífico) o eutanasiados para la realización de necropsias por razones ajenas a este estudio.

De los animales seleccionados se recolectaron las siguientes muestras.

- Muestras de conjuntiva del tercer párpado: luego de exteriorizar el tercer párpado, se tomó un fragmento de mucosa (a la derecha o izquierda de la línea media) (figura 7) con una pinza y se escindió con tijera (O'Rourke et al., 2002). Las muestras se conservaron en formol bufferado al 10% (Na_2HPO_4 -anhidro- 6,5%, NaH_2PO_4 4%, formaldehido 10%) hasta su procesamiento. Esta muestra fue tomada en solo 57 ovinos y 37 caprinos debido a que en el proceso de desuello en el frigorífico puede dañarse el tercer párpado. Se priorizó la muestra de tercer párpado completo por poseer mayor material para los estudios histológicos.
- Muestras de mucosa rectal: Para las muestras de mucosa rectal se siguió la metodología descrita por Espenes et al. (2006). Para ello se tomaron muestras de mucosa de 1-2 cm aproximadamente a craneal de la línea rectoanal, dorso o ventro lateralmente con pinza y tijeras. Las muestras se conservaron en formol bufferado al 10% hasta su procesamiento.
- Tercer párpado completo: luego de exteriorizarlo, se extrajo la totalidad de este órgano del ojo contralateral al que previamente se le tomó la muestra de mucosa. Se conservó en formol bufferado al 10% hasta su procesamiento.
- SNC: con la cabeza separada del cuerpo del animal a nivel de la articulación atlanto-occipital, se introdujo una cuchara para muestreos (ver figura 6) con la punta hacia abajo a través de la parte superior del foramen magno hasta llegar al tope. Luego se giró la cuchara 180° hacia ambos lados y se extrajo el material con la punta de la cuchara mirando hacia arriba. La muestra se conservó en formol bufferado 10% hasta su procesamiento.



Figura 6. Cuchara descartable utilizada para el muestreo del tronco encefálico de bovinos y pequeños rumiantes para el diagnóstico de EET animales. El tamaño difiere entre las especies.

Adicionalmente se tomaron las siguientes muestras:

- Linfonódulos mesentéricos y/o retrofaríngeos de 4 ovinos y 4 caprinos al azar y se conservaron en formol bufferado al 10% hasta su procesamiento.
- Linfonódulos mesentéricos y/o retrofaríngeos de 4 ovinos al azar y se conservaron en solución fijadora de zinc (SFZ) (ZnCl 0,5%; acetato de zinc 0,5% en Tris 0,1 M; CaCl₂ 0,05% pH 7-7,4) modificada de Beckstead (1994).
- Muestras de recto, desde el ano hasta 4 cm hacia proximal de 15 ovinos al azar durante sus respectivas necropsias y se conservaron en formol bufferado al 10% hasta su procesamiento.



Figura 7. A la izquierda se observa la superficie bulbar del tercer párpado de una oveja. La flecha inferior indica el tejido linfoide levemente sobreelevado. La flecha superior indica la zona donde se escindió el TL del otro lado (O'Rourke et al., 2002). A la derecha se observa la superficie bulbar del tercer párpado de una cabra durante los muestreos de esta tesis.

Procesamiento histológico de las muestras

Una vez fijadas, las muestras fueron deshidratadas por inmersión en concentraciones crecientes de etanol (80%, 96% y 100%) y aclaradas con xileno. Luego fueron incluidas en parafina y se obtuvieron cortes seriados de 3 μ m de espesor. Uno de ellos se montó en un portaobjetos tradicional para su coloración con hematoxilina y eosina (Luna, 1968). El resto fue montado en portaobjetos positivados para su análisis inmunohistoquímico.

Identificación del TL en tercer párpado

La presencia de TL se evaluó mediante observación microscópica de las secciones coloreadas con hematoxilina y eosina en un microscopio óptico, tanto en la muestra de mucosas como en el tercer párpado completo. En este último caso, el mismo se cortó en 2 o 3 fragmentos dependiendo del tamaño de la pieza (a los costados de la línea media, mismo sitio de la toma de muestras de mucosa) y se observaron al menos 2-3 secciones longitudinales del mismo. Se contabilizó el número de folículos linfoides presentes en cada una de las muestras.

Identificación del TL en mucosa rectal

Debido a la diferencia de criterios descripta por diferentes autores, se evaluó la presencia de folículos linfoides y su distribución en muestras de mucosa rectal (Aleksandersen et al. 1991; Espenes et al. 2006; Gonzalez et al. 2008; Keane, Barr, Osborn, Langenberg, K. I. O'Rourke, et al. 2009).

Para ello se tomaron muestras de mucosa rectal de 35 ovinos en dos sitios diferentes:

- Muestra A: inmediatamente craneal a la unión mucocutánea.
- Muestra B: a 2 cm de la unión mucocutánea.

Además, se evaluaron secciones del recto de 15 ovinos de aproximadamente 3-4 cm desde la unión mucocutánea.

La presencia de TL se evaluó mediante observación microscópica de las secciones obtenidas, coloreadas con hematoxilina y eosina.

Detección IHQ de marcadores celulares

Con el objeto de identificar las poblaciones celulares presentes en el TLAM se buscó detectar CDF y Linfocitos B mediante la detección del antígeno CD21, Linfocitos T totales mediante la detección de CD3, linfocitos T colaboradores mediante la detección de CD4, Linfocitos T citotóxicos mediante la detección del antígeno CD8 y macrófagos mediante el antígeno L1 (ver tabla 4), se utilizaron las muestras de ganglios linfáticos fijadas en formol y SFZ como controles y se probaron diluciones de 1:100, 1:500 y 1:1000 de cada anticuerpo.

La técnica de IHQ se realizó sobre las secciones de tejido montadas sobre portaobjetos positivados. Luego del desparafinado en xileno y alcoholes de graduación decreciente (100%, 96%, 80%), los cortes se sumergieron en peróxido de hidrogeno al 3% en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Luego de este paso, se realizó la recuperación antigénica apropiada para cada anticuerpo (ver más adelante). Posteriormente la reacción antígeno-anticuerpo fue revelada mediante el sistema *Envision* (Dako), utilizando 2,3 diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromógeno.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Célula Blanco</i>	<i>Clon</i>	<i>Origen</i>
<i>CD21</i>	Linfocitos B maduros y células dendríticas foliculares (González et al., 2001).	CC21	Bio-Rad
		GB25A	Washington State University
		EP64	Bio SB
<i>CD3</i>	Linfocitos T (Schwinzer et al., 1991).	Policlonal	Cell Marque
<i>L1 (Calprotectin)</i>	Macrófagos, granulocitos y monocitos (Flavell et al., 1987)	MAC387	Bio-Rad
<i>CD68</i>	Macrófagos y monocitos (Micklem et al., 1989).	KP-1	Bio SB
<i>CD4</i>	Linfocitos T colaboradores (Maddox et al., 1985).	GC1A	Washington State University
		44.38	Bio-Rad
<i>CD8</i>	Linfocitos T citotóxicos (Maddox et al., 1985)	38.65	Bio-Rad

Tabla 4. Anticuerpos para la detección de células en la técnica de IHQ probados en el desarrollo de esta tesis.

Para la optimización de la técnica IHQ de cada anticuerpo se probaron diferentes métodos de recuperación antigénica:

Recuperación antigénica inducida por calor (RAIC):

Método de calor húmedo en horno de microondas (15-30 minutos) con las siguientes soluciones:

- Buffer citrato pH 6 (ácido cítrico 10 mM, 0,05 % de tween 20).
- Buffer tris-EDTA pH 9 (tris 10 mM, EDTA 1 mM, 0,05 % de tween 20).
- Solución *Target Retrieval Solution*, Citrate pH 6 (Dako).
- Solución *ImmunoDNA Retriever Citrate* (Bio SB).

Recuperación antigénica inducida por enzimas (RAIE):

- Proteínasa K lista para usar (Dako) a temperatura ambiente. Incubaciones de 15, 30 y 45 minutos.
- Tripsina 0,1% con CaCl₂ 0,1% a 37°C. Incubaciones de 15, 30, 45 minutos y 3 horas.

Debido a que varios anticuerpos no habían sido probados en tejidos de ovinos se realizaron pruebas de inmunoreactividad sobre estos tejidos. Para ello se utilizó como control linfonódulo (LN) de ovino fijado en SFZ. Esta solución fijadora, a diferencia del formol, no produce modificaciones en las proteínas. De esta manera, los antígenos no sufrirían alteraciones que puedan impedir la unión de anticuerpos específicos por lo que no se necesita recuperación antigénica. Por eso, utilizando tejidos fijados en SFZ se evalúa la interacción del antígeno (marcador celular) de esa especie con el anticuerpo a probar, teniendo efecto mínimo la fijación y el procesamiento del tejido sobre la interacción antígeno-anticuerpo. Los resultados de estas pruebas se resumen en las tablas 5 y 6. Los anticuerpos anti-CD68 (Bio SB) y anti CD21 (Bio SB) dieron negativo a esta prueba.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Clon</i>	<i>Reactividad declarada</i>	<i>Reactividad frente a LN ovino fijado en SFZ</i>
<i>CD21</i>	CC21	Bovino, ovino , caprino, ciervo colorado, ciervo mula	+
	GB25A	Bovino, ovino , caprino	+
	EP64	Humano, ratón	-
<i>CD3</i>	Policlonal	Humano, canino, ratón	+
<i>L1</i>	MAC387	Equino, porcino, canino, conejo, ratón, bovino, felino, caprino y otros.	+
<i>CD68</i>	KP-1	Humano, rata, ratón, porcino, conejo, hámster, primate no-humano	-
<i>CD4</i>	GC1A	Ovino , caprino	+
	44.38	Ovino , caprino	+
<i>CD8</i>	38.65	Ovino , caprino, bovino	+

Tabla 5. Resultados de las pruebas de optimización de anticuerpos para la técnica de IHQ. Se muestran los resultados de reactividad frente a LN ovino fijado en SFZ. Se consideró “reactividad declarada” a la información dada por los fabricantes. LN: linfonódulo; SFZ: solución fijadora de zinc.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Clon</i>	<i>Método de RA</i>
<i>CD21</i>	CC21	RAIC: Target Retrieval Solution Citrate (Dako); Target Retrieval Solution with Citrate (Bio SB)
	GB25A	RAIC: Target Retrieval Solution Citrate (Dako); Target Retrieval Solution with Citrate (Bio SB)
<i>CD3</i>	Policlonal	RAIC: Buffer citrato pH 6; Target Retrieval Solution with Citrate (Bio SB)
<i>L1 (Calprotectin)</i>	MAC387	RAIC: Buffer tris-EDTA pH 9

Tabla 6. Resultados de las pruebas de optimización de anticuerpos para la técnica de IHQ. Se muestran todos los métodos de recuperación antigénica (RA) que dieron una reactividad positiva en tejidos ovinos y caprinos fijados en formol. RAIC: recuperación antigénica inducida por calor.

Marcadores celulares a evaluar

Si bien se evaluaron varios anticuerpos para marcadores celulares diferentes, se seleccionaron aquellos que dieron buenos resultados en tejidos fijados con formol, ya que este fue el fijador utilizado para las muestras a evaluar. Por tal razón se determinaron las poblaciones celulares CD3+ con el anticuerpo de *CellMarque* (dilución 1:500), CD21+ con el anticuerpo de *WSU* y *Bio-Rad* (dilución 1:500) y L1+ con el anticuerpo de *Bio-Rad* (dilución 1:100).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos de la toma de muestra rectal a distintas distancias de la unión mucocutánea, se aplicó la prueba estadística de Kruskal Wallis. Esta prueba no paramétrica se utilizó para confirmar que las diferencias en el número de folículos linfoides observados entre las muestras tomadas inmediatamente anterior a la unión mucocutánea (muestra A) y aquellas tomadas a 2 cm de la unión (muestra B) fueran significativas.

Con respecto a la aptitud diagnóstica, para determinar si las diferencias entre ambos tipos de muestras (A y B) son significativas se realizó una tabla de contingencia utilizando la prueba estadística de χ^2 (chi cuadrado).

Para determinar si las diferencias en la aptitud diagnóstica observada entre animales menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses fueran significativas, se utilizó la prueba estadística de χ^2 (chi cuadrado).

Para determinar la significación estadística observada en la marcación de CD21 entre los ovinos menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses; y entre el tejido linfoide de la mucosa rectal y el tercer párpado, se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney-Wilcoxon. Los tejidos se

evaluaron de manera semicuantitativa, adaptando los criterios de do Prado Duzanski et al. (2022), se le asignó un valor dependiendo el porcentaje de células marcadas dentro de cada folículo. Los valores fueron: 0=sin marcación apreciable a un aumento de 40X; 1 = <25%; 2 = 26–50%; 3 = 51–75%; y 4 = >75%. Se evaluaron 6 folículos al azar de cada muestra. Los datos se analizaron como el promedio de las observaciones de cada individuo.

Para todo el análisis estadístico se utilizó el software *InfoStat*.

Resultados

Muestreo

Se alcanzó a obtener el número propuesto de ovinos de las edades de interés. Esto no fue posible para el caso de los caprinos adultos. La situación de pandemia declarada en marzo de 2020 obligó a suspender los muestreos en establecimientos y dificultó el ingreso a frigoríficos debido a la implementación de medidas de prevención frente a COVID19. Una vez normalizada las actividades de faena, no se encontraron frigoríficos/mataderos que operaran con animales adultos, priorizando la faena de animales jóvenes (cabritos) y de manera estacional. De esta manera, respecto de los caprinos el estudio se centrará en animales jóvenes.

Evaluación de la presencia del tejido linfoide asociado a mucosa rectal

En las secciones de recto completo de ovinos se observó TL inmediatamente craneal de la unión rectoanal (hasta 1 cm aproximadamente) en 15/15 de los individuos. Craneal a esta distancia solo 2/15 individuos mostraron tejido linfoide asociado a mucosa rectal en los cortes analizados (ver figura 9a).

Teniendo en cuenta las muestras tomadas a 2 distancias diferentes a la unión mucocutánea, se comparó su aptitud diagnóstica. Se consideraron aptas aquellas muestras que presentaron 6 folículos linfoides o más según lo establecido por O'Rourke et al. (2000).

De las muestras tomadas inmediatamente posterior a la unión mucocutánea (muestra A), 23/35 se consideraron aptas para el diagnóstico mientras que solo 6/35 de las muestras tomadas a 2 cm de la unión (muestra B) fueron aptas (ver figura 8).

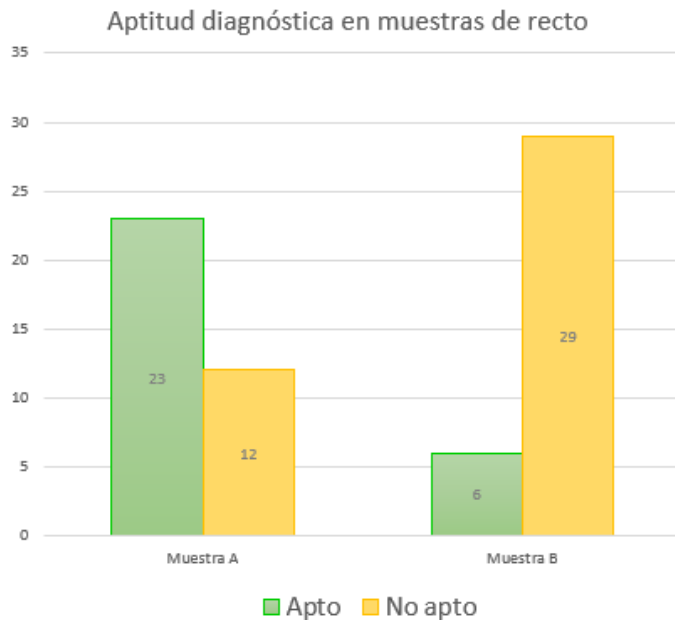


Figura 8. Aptitud diagnóstica de las muestras de mucosa rectal de ovinos tomadas inmediatamente posterior a la unión mucocutánea (muestra A) y tomadas a 2 cm de la unión mucocutánea (muestra B).

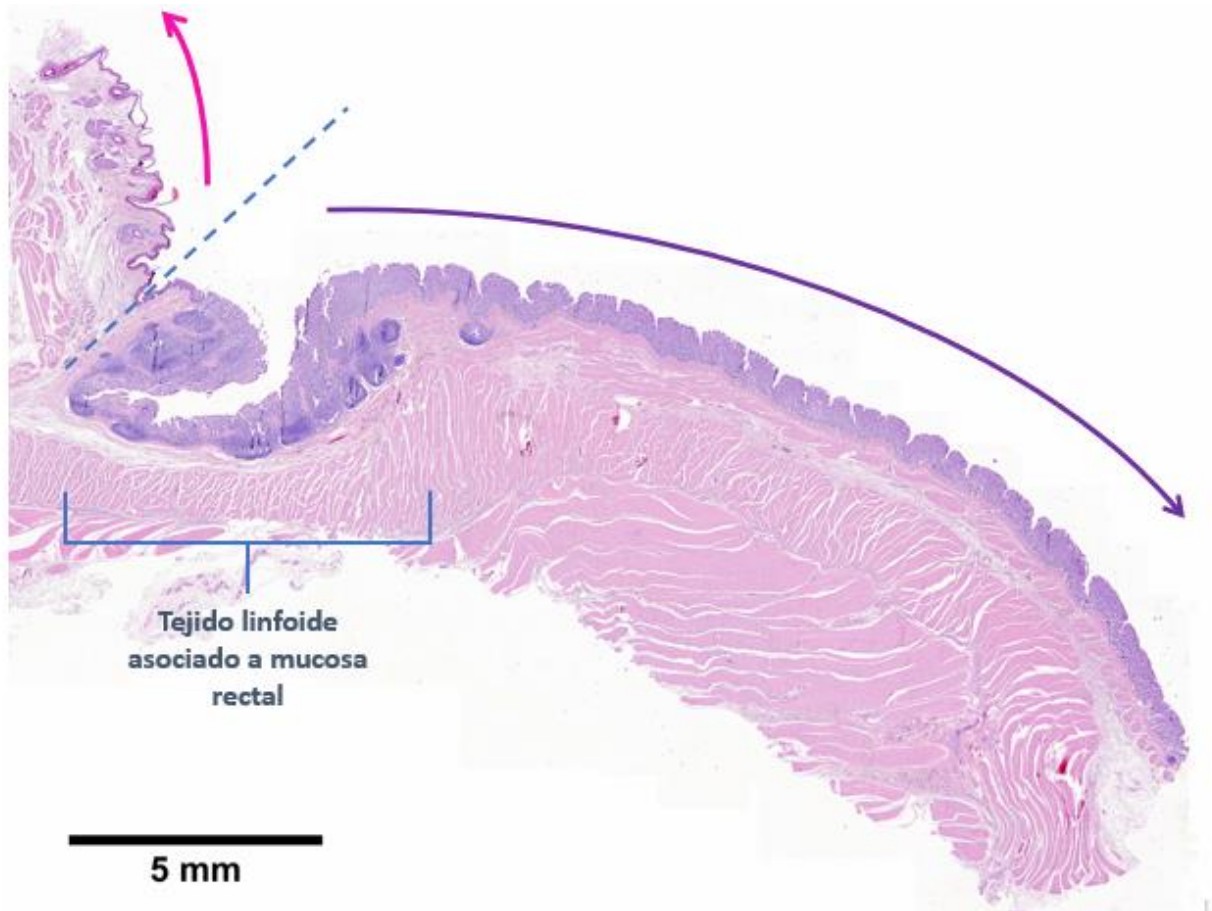


Figura 9a. Corte longitudinal del recto de un ovino teñido con hematoxilina y eosina. La flecha fucsia se ubica sobre el epitelio de la piel. La flecha violeta se encuentra sobre la mucosa rectal. La línea entrecortada azul indica la unión mucocutánea (línea recto-anal). Se observa el tejido linfoide asociado a la mucosa rectal inmediatamente a craneal de la unión mucocutánea. Escaneado con *Microvisioneer Manual Scanner*^R.

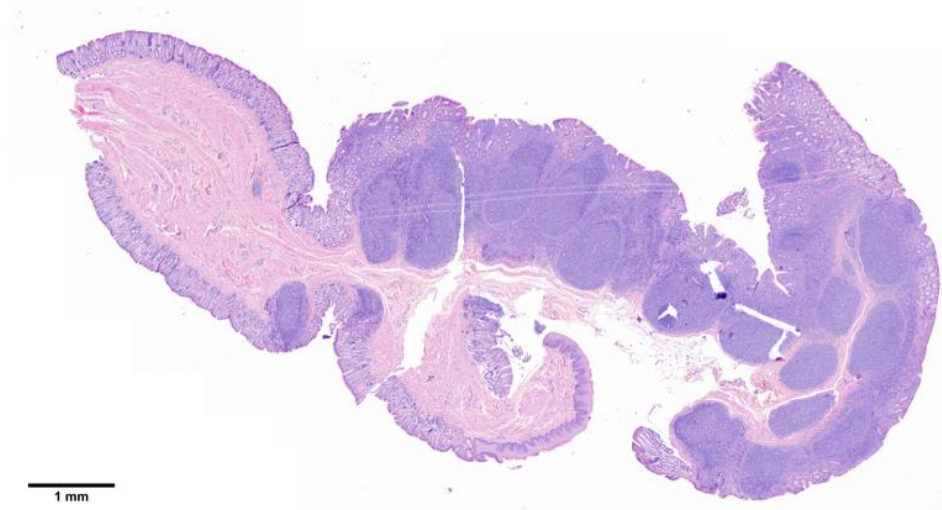


Figura 9b. Corte de la mucosa rectal de un ovino teñido con hematoxilina y eosina. Se observa gran cantidad de tejido linfoide asociado a la mucosa rectal. Escaneado con *Microvisioneer Manual Scanner*^R.

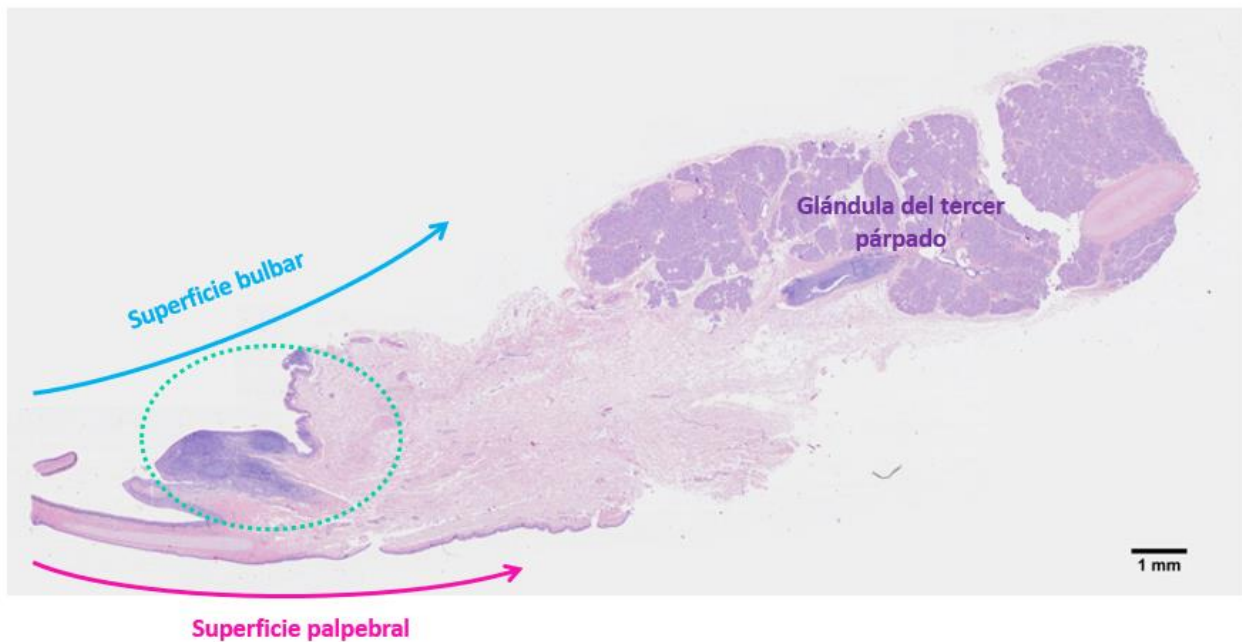


Figura 9c. Corte longitudinal del tercer párpado completo de un ovino teñido con hematoxilina y eosina. La línea entrecortada verde indica la ubicación del tejido linfoide asociado a la mucosa del tercer párpado en relación a la superficie bulbar. Escaneado con *Microvisioneer Manual Scanner*^R.

Evaluación de la aptitud diagnóstica de las muestras

Se evaluó la aptitud de todas las muestras de mucosa de tercer párpado y mucosa rectal, mediante la tinción de Hematoxilina y Eosina (HyE) (ver figuras 9b y 9c). Para ello, uno de los cortes de cada muestra, luego de ser procesado y teñido con H-E, fue observado en un microscopio óptico.

Se consideraron aptas aquellas muestras que presentaron 6 folículos linfoides o más según lo establecido por O'Rourke et al., (2002). Comparando la aptitud diagnóstica del total de las diferentes muestras utilizadas en el diagnóstico de scrapie se obtuvieron los siguientes resultados: de las muestras conjuntivales de tercer párpado fueron aptas solo el 1,8% (1/57) en ovinos y el 5,4% (2/37) en caprinos (ver figura 10a); en cuanto a las muestras de mucosa rectal se observó que el 61.1% (33/54) de las muestras de caprinos y el 39,4% (26/66) de las muestras de ovinos cumplieron el criterio de aptitud para diagnóstico de scrapie (ver figura 10b).

Analizando 2-3 cortes del tercer párpado completo se obtuvo un 50% (27/54) de cortes aptos en caprinos y un 16,7% (11/66) aptos en ovinos (graficado en la figura 10b).

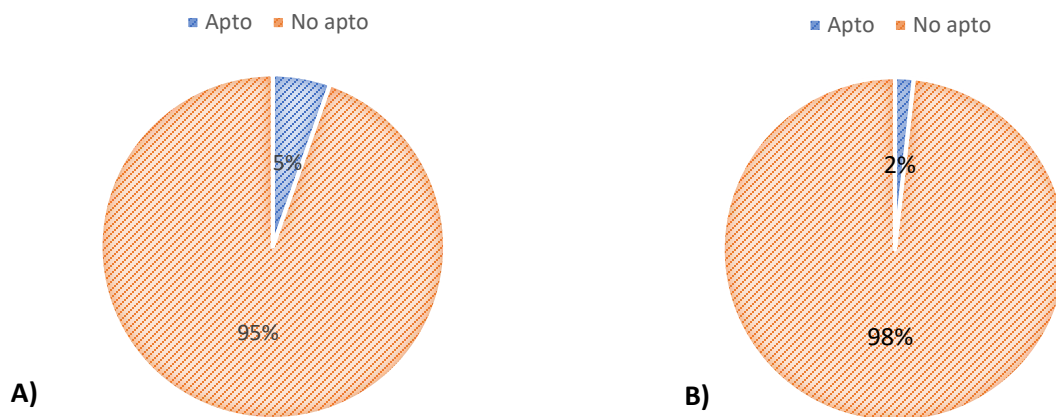


Figura 10a. Aptitud diagn3stica del total de las muestras conjuntivales de caprinos (A) y ovinos (B). Los valores fueron redondeados.

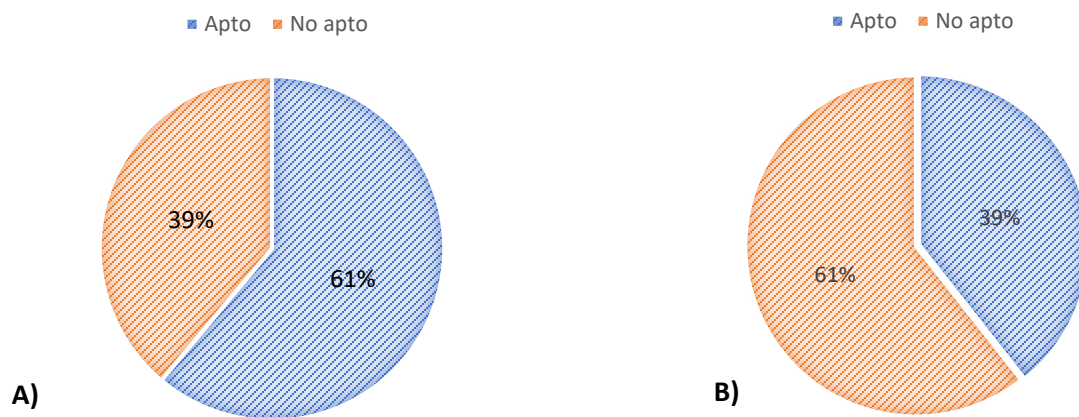


Figura 10b. Aptitud diagn3stica del total de las muestras de mucosa rectal de caprinos (A) y ovinos (B). Los valores fueron redondeados.

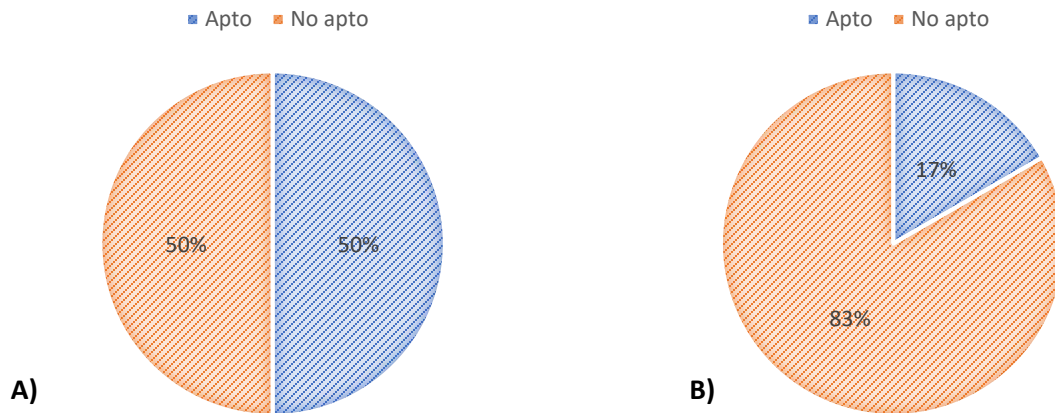


Figura 10c. Aptitud diagnóstica del total de las muestras de tercer párpado completo de caprinos (A) y ovinos (B). Los valores fueron redondeados.

Se comparó la aptitud diagnóstica entre ovinos menores de 18 meses (Grupo J) y mayores de 18 meses (Grupo G) para evaluar diferencias en la aptitud diagnóstica entre ambos grupos etarios. En los ovinos mayores a 18 meses se observó que 14/30 muestras de mucosa rectal, 1/28 muestra de mucosa de tercer párpado y 4/30 de los terceros párpados analizados fueron consideradas aptos para diagnóstico de scrapie. En ovinos menores de 18 meses se observó que 12/36 muestras de mucosa rectal, 0/29 muestra de mucosa de tercer párpado y 7/36 de los terceros párpados analizados fueron consideradas aptos para diagnóstico de scrapie. Los resultados se muestran graficados en la figura 11.

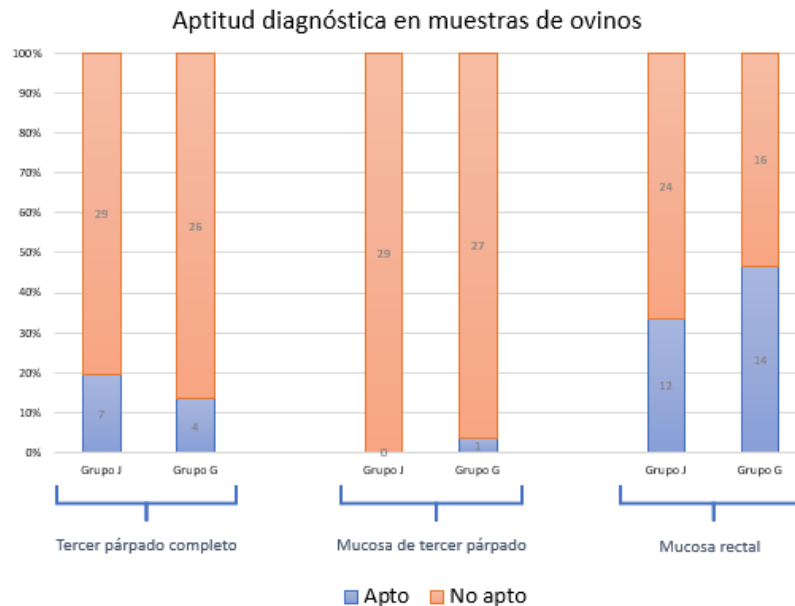


Figura 11. Aptitud diagnóstica de las muestras de ovinos separadas por grupo etario. Grupo J: menores de 18 meses; Grupo G: mayores de 18 meses.

Caracterización de células del tejido linfoide

Células CD21+

Con los anticuerpos anti-CD21 se observó inmunomarcación en los folículos linfoides, en la membrana plasmática celular. Debido a la ubicación en membrana de CD21 y la morfología de las CDF con abundantes prolongaciones citoplasmáticas, el patrón de marcación observado tiene aspecto reticular (ver figura 12), mostrando en la mayoría de los casos una coloración completa de la membrana de las células marcadas.

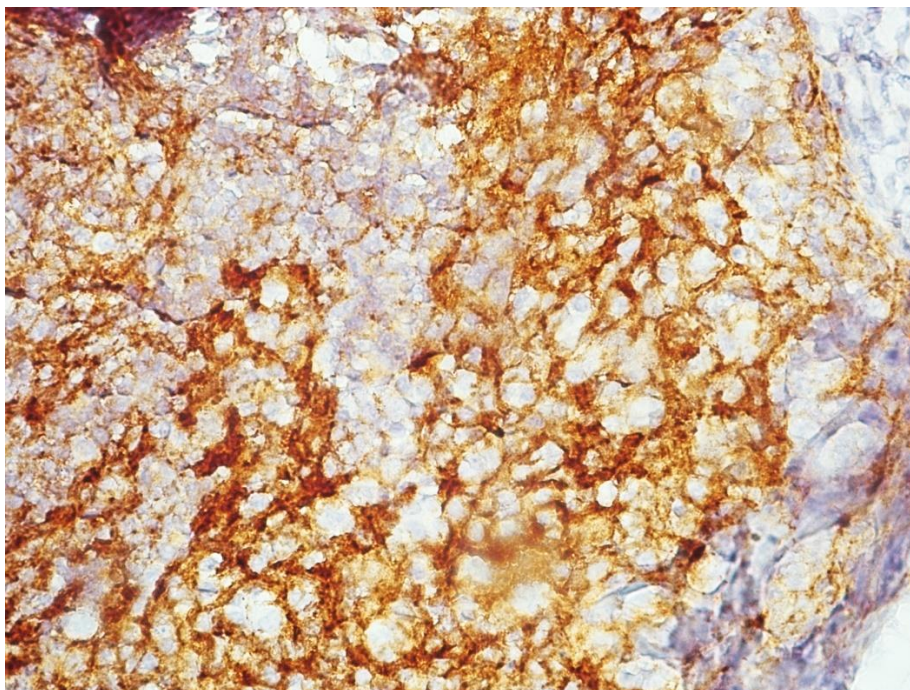


Figura 12. Detección inmunohistoquímica de CD21 en tejido linfoide asociado a mucosa rectal de un caprino. Se observa la inmunomarcación (granulado marrón-rojizo) de aspecto reticular en un folículo linfoide. Inmunohistoquímica con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X40.

Las células CD21+ se observaron principalmente en el centro de los folículos, coincidente con los centros germinales (ver figura 15). Sin embargo, también pudo observarse marcaciones del folículo completo en algunos casos (ver figura 13). La marcación de células de forma extrafolicular fue mínima, presentándose solo en algunos casos.

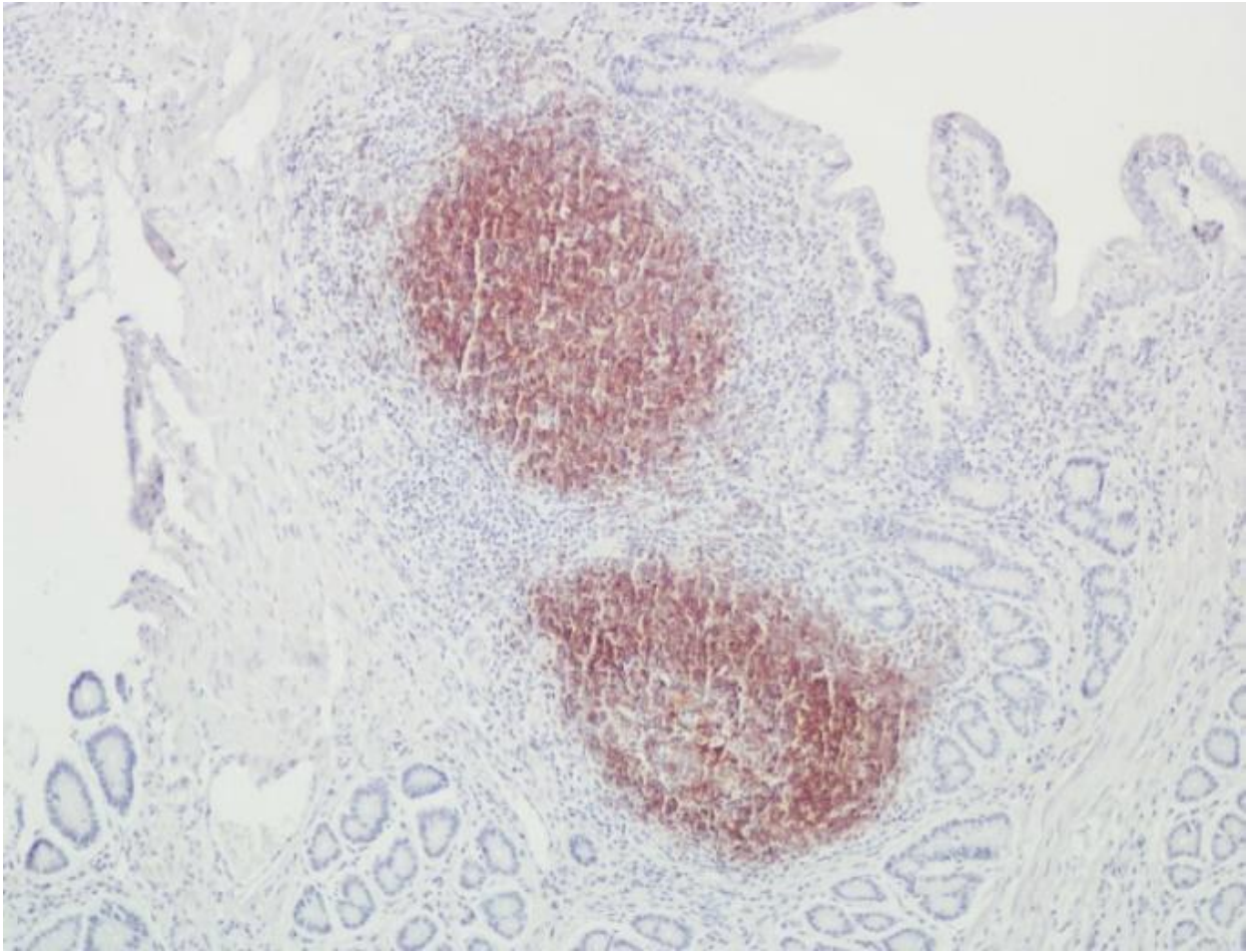


Figura 13. Detección inmunohistoquímica de CD21 en tejido linfoide asociado a mucosa rectal de un caprino. Los dos folículos linfoides que se observan en la imagen muestran inmunoreactividad (granulado marrón-rojizo) ante los anticuerpos monoclonales GB25A. Inmunohistoquímica con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, 4X.

En el tejido linfoide asociado a mucosa de tercer párpado pudo observarse una menor presencia de células CD21+ comparando con el tejido linfoide de mucosas rectales. Incluso muchos folículos resultaron con una marca muy tenue, poco apreciable (ver figura 14) principalmente folículos primarios densamente empaquetados. Para determinar la significancia de estas diferencias se realizó un análisis estadístico.

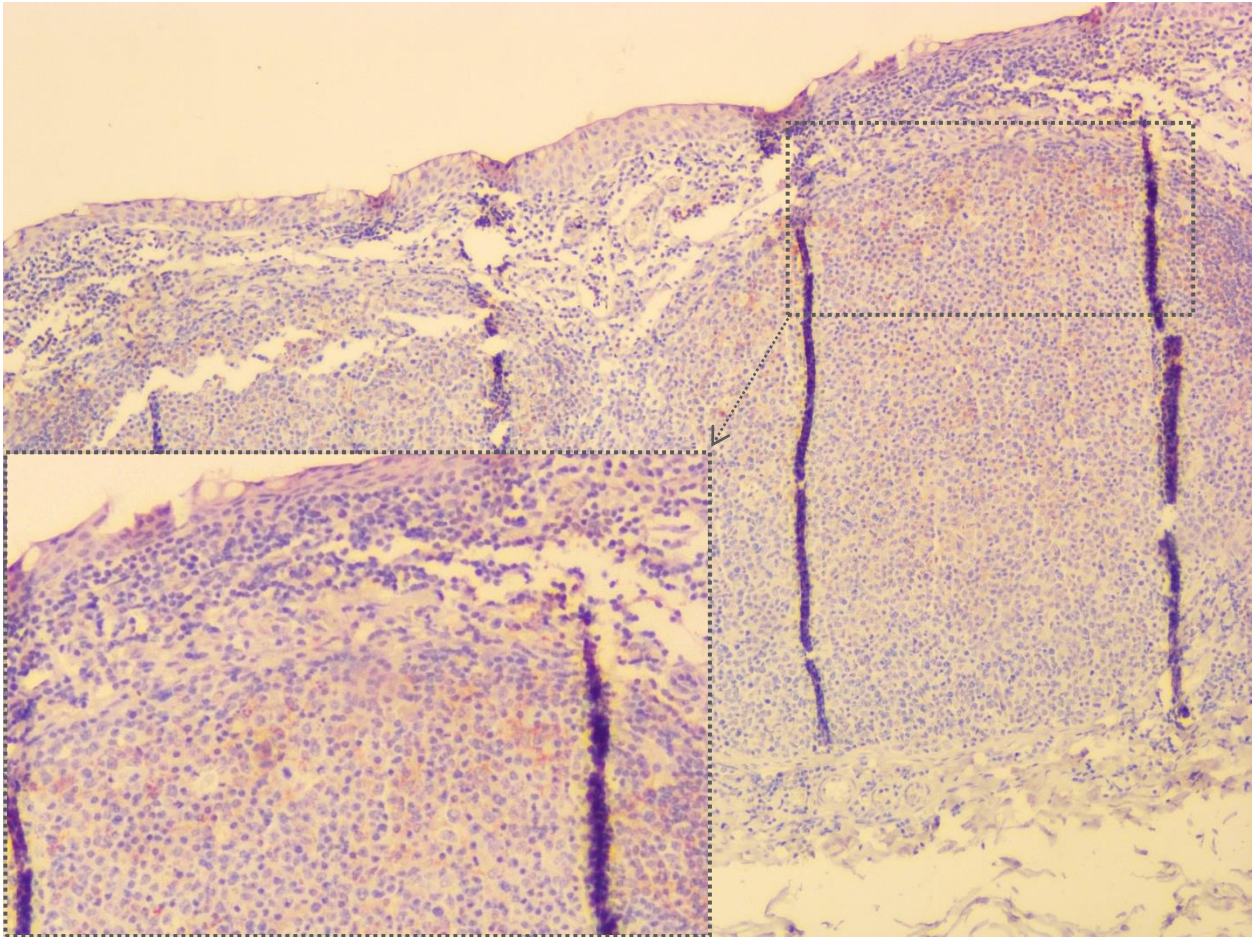


Figura 14. Detección inmunohistoquímica de CD21 en tejido linfoide asociado a mucosa de tercer párpado de un ovino. Se observa una marcación tenue, casi imperceptible (granulado marrón-rojizo) en un folículo primario. Inmunohistoquímica con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X10. El recuadro de puntos se ubica magnificado abajo a la izquierda para una mejor apreciación.

Células CD3+

La inmunomarcación observada con el anticuerpo anti-CD3 (*Cell Marque*) tuvo distribución predominantemente perifolicular, aunque también se observó una cantidad apreciable, aunque mucho menor, dentro de los folículos (ver figura 15). A su vez, también se pudo observar escasas células CD3+ en el tejido conectivo de la submucosa. De acuerdo al criterio de evaluación determinado, no se observaron diferencias subjetivas de inmunomarcación entre los grupos analizados.

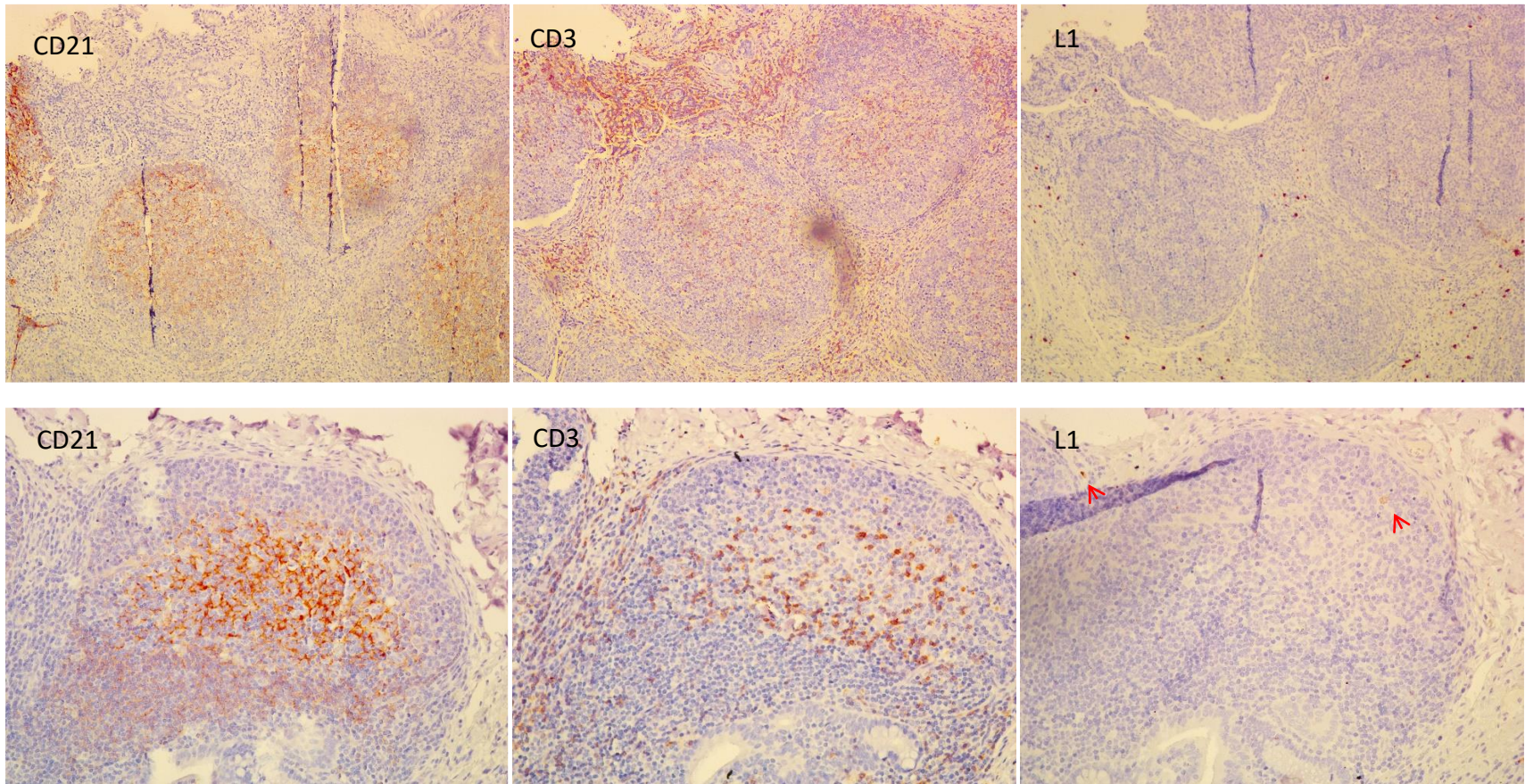


Figura 15. Detección inmunohistoquímica de células del tejido linfoide asociado a mucosa de dos ovinos (CD21, CD3 y L1). Arriba cortes de una muestra de mucosa rectal, 10X. Abajo cortes de una muestra de mucosa de tercer párpado, 20X. Las células positivas a cada marcador celular se observan con un granulado marrón-rojizo. Las células CD21+ se observan principalmente en los centros germinales de los folículos. Las células CD3+ predominan en las zonas perifoliculares, aunque también se observan algunas en el interior de los folículos. Las células L1+ se presentan en una cantidad mucho menor entre los folículos (las flechas rojas indican las únicas células marcadas en la imagen correspondiente al TL del tercer párpado). Inmunohistoquímica con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina.

Células L1+

El anticuerpo utilizado para reconocer macrófagos (anti L1, clon MAC387) reconoce la molécula L1 o calprotectin, un antígeno expresado intracitoplasmáticamente en granulocitos, monocitos y macrófagos tisulares (Brandtzaeg et al., 1988; Flavell et al., 1987). La marcación observada fue más escasa que con los anticuerpos anteriores, limitándose al espacio perifolicular (ver figura 15). También se identificaron células marcadas cercanas al epitelio en las muestras de mucosa rectal (ver figura 16). Pocos folículos mostraron células L1+ en su interior y en el caso de haberlas solo se identificaron una o dos con una marcación muy tenue (ver figura 17). De acuerdo al criterio de evaluación determinado, no se observaron diferencias subjetivas de inmunomarcación entre los grupos analizados.

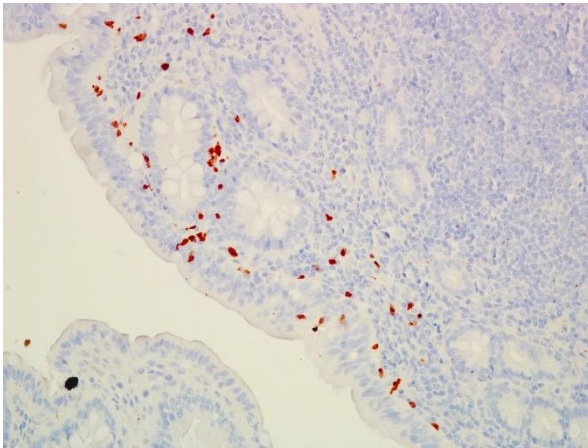


Figura 16. Detección inmunohistoquímica de L1 en tejido linfoide asociado a mucosa rectal de un ovino. Se observan células marcadas (granulado marrón-rojizo) cercanas al epitelio de la mucosa. Inmunohistoquímica con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20.

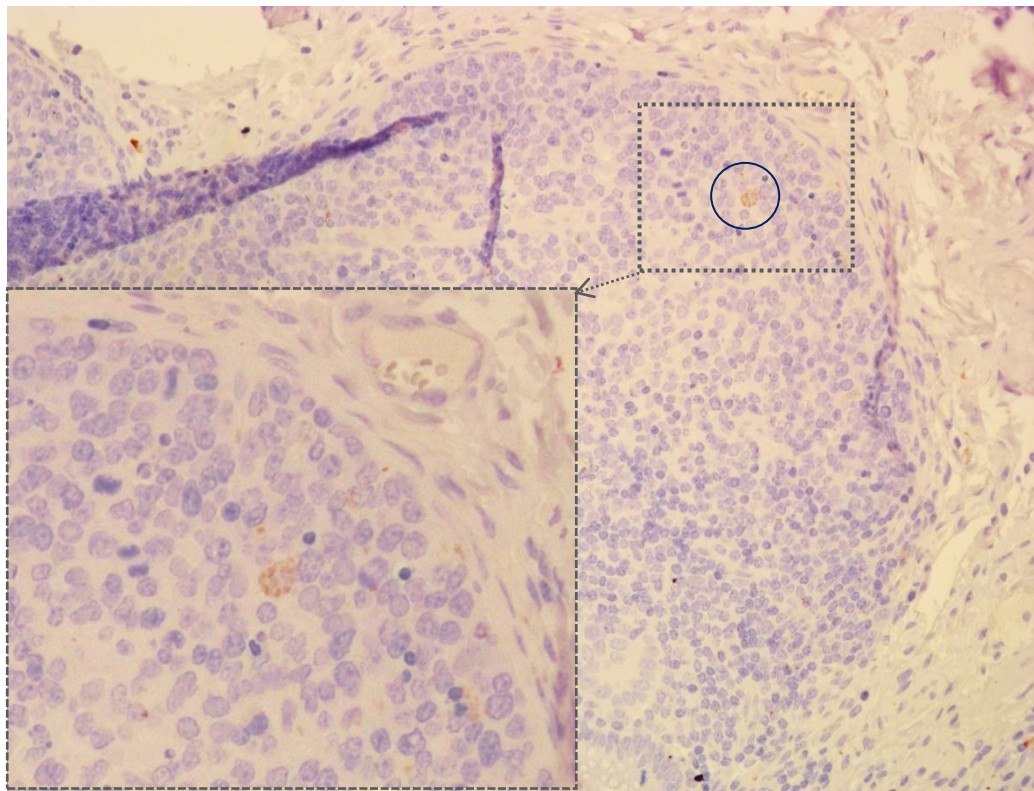


Figura 17. Detección inmunohistoquímica de L1 en tejido linfoide asociado a mucosa de tercer párpado de un ovino. Dentro del círculo se observa una marcación tenue (granulado marrón-rojizo) de una célula dentro de un folículo linfoide. Inmunohistoquímica con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20. El recuadro de puntos se ubica magnificado abajo a la izquierda para una mejor apreciación.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, los datos obtenidos de la toma de muestra rectal a distintas distancias de la unión mucocutánea de ovinos, se aplicó la prueba estadística de Kruskal Wallis. Con esta prueba (no paramétrica) se pudo concluir que las diferencias en el número de FL observados entre las muestras tomadas inmediatamente anterior a la unión mucocutánea (muestra A) y aquellas tomadas a 2 cm de la unión (muestra B) son significativas ($p=0,0007$).

Con respecto a la aptitud diagnóstica, utilizando la prueba estadística de χ^2 (chi cuadrado) se pudo concluir que las diferencias entre ambos tipos de muestras (A y B) también son significativas ($p<0,0001$). Estos resultados indican que las muestras tomadas inmediatamente anterior a la unión mucocutánea son más adecuadas para el diagnóstico de scrapie.

Para determinar si las diferencias en la aptitud diagnóstica observada entre ovinos menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses fueran significativas, se utilizó la prueba estadística de χ^2 (chi cuadrado). Se pudo concluir que las diferencias entre ambos grupos no son significativas ni en las muestras de tercer párpado completo ($p=0,5$), mucosa de tercer párpado ($p=0,2$) ni en las muestras de mucosa rectal ($p=0,26$) por lo que no habría asociación con la edad.

Para determinar si las diferencias en la marcación de CD21 son significativas entre ovinos menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses se utilizó la prueba estadística Mann-Whitney-Wilcoxon. Se pudo concluir que las diferencias entre ambos grupos no son significativas ($p=0,1273$), por lo que esta variación en la inmunomarcación no estaría asociada con la edad.

Para determinar si las diferencias en la marcación de CD21 son significativas entre el tejido linfoide de la mucosa rectal y el de tercer párpado de ovinos, se utilizó la prueba estadística Mann-Whitney-Wilcoxon. Se pudo concluir que las diferencias entre ambos grupos son significativas ($p=0,002$).

Debido a que la inmunomarcación observada para CD3 y L1 fue similar en todos los grupos no se realizó un análisis estadístico.

Discusión

Detección de TL y evaluación de la aptitud diagnóstica de las muestras

La detección de PrP^{Sc} en muestras de biopsia de mucosa es recomendada como diagnóstico preclínico y antemortem de scrapie (OMSA, 2022). Sin embargo, algunos autores han manifestado dificultades en el diagnóstico de scrapie a partir de este material (Thuring et al., 2005).

En el presente trabajo se logró detectar tejido linfoide en las muestras colectadas, aunque los resultados de la aptitud diagnóstica de las muestras de mucosa de tercer párpado no concuerdan con lo reportado por otros autores. Reportes previos indican que entre el 76-81,9% de las muestras eran aptas para el diagnóstico (Monleón et al., 2011; O'Rourke et al., 2002). En el presente trabajo solo el 1,8% (1/56) de las muestras de ovinos y el 5,4% (2/37) de las muestras de caprinos resultaron aptas.

Considerando que la detección de PrP^{Sc} en tejido linfoide se utiliza como prueba diagnóstica preclínica de scrapie en animales vivos, confirmar la aptitud de la muestra resulta determinante al momento de evaluar los resultados obtenidos. En ese sentido, pocas de las muestras de conjuntiva de tercer párpado analizadas mostraron folículos linfoides suficientes para considerarse aptas para el diagnóstico. Con la intención de determinar si el tejido linfoide presente en el órgano era realmente escaso o si en realidad se encontraba en otra ubicación, se realizaron estudios histológicos del tercer párpado contralateral al analizado por biopsia, observando cortes de las regiones mencionadas como lugar de toma de muestra (O'Rourke et al., 2002). Incluso considerando la observación de cortes del tercer párpado completo (que no sería de utilidad para estudio de animales vivos) se obtuvieron solo un 16,7% (11/66) de muestras con utilidad diagnóstica en ovinos y un 50% (27/54) en caprinos. Esta diferencia entre los resultados de un muestreo por biopsia y la observación de cortes del tercer párpado completo podría relacionarse con un error en la toma de muestra. Podría ocurrir que la biopsia se haya colectado de un área normalmente carente de tejido linfoide en todos los casos. Sin embargo, para el muestreo se siguieron las especificaciones indicadas por O'Rourke et al., (2002) y Monleón et al. (2011), con las cuales obtuvieron los resultados que recomiendan su uso. Más aun, O'Rourke asegura que el tejido linfoide es visualizable en la superficie bulbar como un tejido rosado ligeramente elevado a ambos lados de la línea media longitudinal del tercer párpado, indicando que esta es la zona a muestrearse, aunque no se observe la elevación mencionada. Contrariamente, tales estructuras no se observaron en la mayoría de los individuos muestreados para este trabajo (ver figura 7), siendo detectadas solo en algunos de los ovinos muestreados. De todas maneras, como se recomienda en dicha publicación, se colectó el tejido en el área indicada, encontrando un número muy bajo de muestras aptas para diagnóstico.

En el mismo sentido, otros autores también manifestaron la imposibilidad de identificar macroscópicamente el tejido linfoide en la mucosa de tercer párpado en este tipo de muestreos. Thuring et al., (2005) indicaron que las protuberancias del tercer párpado apenas fueron identificables en las ovejas que evaluaron, e incluso la

sección en serie de un tercer párpado dio como resultado la detección de solo unos pocos folículos linfoides, coincidiendo con los resultados aquí presentados. Así, los autores propusieron que este hecho se debiera a que las ovejas no tuvieran demasiada exposición a agentes capaces de estimular el desarrollo de tejido linfoide en la conjuntiva (microorganismos, partículas de polvo y otros agentes irritantes). Algo similar podría haber ocurrido en los animales del presente trabajo. Los mismos se habrían criado de manera extensiva en el centro de la provincia de Buenos Aires sin exponerse a los ambientes saturados frecuentes de los sistemas productivos intensivos (poca ventilación, presencia de irritantes, mayor incidencia de enfermedades infecciosas respiratorias). Esto también respondería a los resultados encontrados en caprinos. La cantidad de folículos linfoides encontrados en tercer párpado fue mayor a lo observado en ovinos. Los caprinos provenían de un sistema de producción semi-intensivo, por lo que es probable que hayan estado expuestos a las condiciones irritantes ya mencionadas y en consecuencia tener más desarrollo de tejido linfoide asociado a conjuntiva.

Con respecto a la aptitud diagnóstica de las muestras de mucosa rectal, los resultados obtenidos indican que el 39,4% de los ovinos y 61% de los caprinos resultaron aptos para el diagnóstico. Estos resultados son mejores a los obtenidos para la mucosa del tercer párpado, acercándose a los reportados por otros autores en trabajos previos realizados en otras regiones que indicaron un 66% de muestras aptas (Monleón et al., 2011). Según los procedimientos descritos por Espenes et al. (2006), basados a su vez en descripciones de Aleksandersen et al. (1991), la muestra debe tomarse aproximadamente a 2-3 cm craneal a la línea recto-anal. Otros autores señalan que la muestra ideal debe tomarse de 0 a 1 cm a partir del inicio de la mucosa (Gonzalez et al., 2008; Keane et al., 2009). Debido a estas discrepancias, en el desarrollo de esta tesis se evaluaron muestras colectadas según ambos protocolos (Espenes et al., 2006; Gonzalez et al., 2008) para comparar su aptitud diagnóstica. Los resultados obtenidos coinciden con los de Gonzalez et al. (2008) y Keane et al. (2009) ya que se obtuvieron una mayor proporción de muestras aptas tomándolas inmediatamente craneal a la línea recto-anal (66% contra 17% de muestras consideradas aptas en este ensayo particular). Además, en 15 ovinos se analizaron secciones longitudinales de recto teñidos con HyE (ver figura 9a) y se observó que el tejido linfoide asociado a mucosa rectal se concentra inmediatamente craneal de la unión mucocutánea (línea recto-anal).

Respecto de la edad de los animales, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de folículos linfoides de muestras de ovinos menores o mayores a 18 meses de edad en ninguna de las dos muestras analizadas (mucosa rectal y tercer párpado completo). Los autores de un estudio similar que encontraron diferencias por edad categorizaron a los animales en una mayor cantidad de grupos etarios. En el caso de la mucosa del tercer párpado, O'Rourke et al. (2002) encontraron que la cantidad de tejido linfoide disminuía con la edad y recomendaba utilizar esta muestra hasta los 36 meses. En el caso del tejido linfoide asociado a mucosa rectal Monleón et al. (2011) y

Spraker et al. (2006) encontraron resultados similares, disminuyendo la cantidad de folículos también con la edad. En esta tesis, las variaciones entre las distintas edades podrían no haberse observado debido al criterio de clasificación por edad utilizado, pudiendo abarcar el grupo “Mayores a 18 meses” un rango de edad demasiado amplio para observar diferencias. Durante el desarrollo de los muestreos intentamos realizar agrupamientos por edad más específico (datos no presentados). Sin embargo, la dinámica productiva del sector (elevada informalidad, envíos a faena sin programación, etc.) hizo compleja la recolección de muestras de animales de diferentes edades.

Metodología empleada en la caracterización de poblaciones celulares

Para la caracterización inmunohistoquímica de las poblaciones celulares del TL asociado a la mucosa rectal y de la conjuntiva del tercer párpado se probaron diversos anticuerpos para marcadores celulares observándose inmunomarcación con los anticuerpos anti-CD21 (WSU y Bio-Rad), anti-CD3 (CellMarque) y anti-L1 (Bio-Rad).

Se evaluó la identificación de células CD4+ y CD8+ en tejido fijado en formol, aunque sin éxito. Los antígenos CD4 y CD8 son considerados inestables en tejidos fijados en formol y suelen utilizarse otros métodos de fijación en estudios inmunológicos que requieran revelar su presencia. A pesar de que existen reportes de inmunomarcación utilizando RAIC con *buffers* de pH alcalino como por ejemplo el tris pH 9 (Kim et al., 2004), en esta tesis dichos marcadores no pudieron ser detectados bajo las condiciones evaluadas en tejidos fijados en formol. En su trabajo, Kim et al. (2004) evalúan anticuerpos contra cada antígeno (CD4 o CD8) fabricados a partir de diferentes clones, obteniendo resultados solo con dos anticuerpos que no fueron probados en el desarrollo de esta tesis. Muy posiblemente este hecho sea atribuible a los efectos de la solución fijadora utilizada en los ensayos. El formaldehído es un buen preservante de la morfología celular pero debido a la formación de enlaces cruzados entre aminoácidos, algunos epítopes quedan “enmascarados”. Este proceso puede revertirse, en muchos casos, mediante los tratamientos de recuperación antigénica (RA) ya descritos, previo a la realización de la técnica inmunohistoquímica (Cattoretti et al., 1993). En algunos antígenos esta RA no da buenos resultados y este podría ser el caso de los marcadores CD4 y CD8. Otros autores ya reportaron la imposibilidad de detectar estos antígenos luego de una fijación con formaldehído, aunque sí fue posible detectarlos a partir de tejidos congelados (Beckstead, 1994; Breugelmans et al., 2011; Hicks et al., 2006). La criopreservación es uno de los mejores métodos de conservación antigénica, pero posee algunas desventajas: poca conservación de la morfología celular y tisular y necesidad de contar con un criostato, así como también dificultades en mantener la temperatura adecuada durante el transporte y almacenamiento de las muestras, lo que hizo que este método no sea factible de aplicar en el desarrollo de esta tesis.

Como alternativa, se exploró el uso de una solución *buffer* con sales de zinc (SFZ) para la fijación de linfonódulos, que ya ha sido utilizado con éxito para la marcación de

células de tejido linfóide de ovinos (Breugelmans et al., 2011; González et al., 2001). Con esta metodología, la fijación se realiza a temperatura ambiente y posee una buena conservación morfológica y antigénica de los tejidos también observada por estos mismos autores. Las pruebas realizadas con muestras de LN ovinos fijadas con SFZ permitieron detectar los antígenos CD4 y CD8. Sin embargo, a pesar de las características mencionadas para la SFZ, se decidió mantener al formol bufferado al 10% como solución fijadora de rutina para esta tesis. Esta decisión se basó en las características de la SFZ y las de las muestras a analizar. La fijación con SFZ tiene ciertas desventajas operativas que dificultan su implementación, como son el corto tiempo de fijación y la necesidad de procesamiento urgente. Con la utilización de tiempos de fijación más largos de un par de días los tejidos se encojen pudiéndose modificar su estructura (Benavides et al., 2006). Esta imposibilidad de mantener los tejidos en la SFZ por mucho tiempo complica la logística de muestreos a grandes distancias del lugar de procesamiento, lo cual ocurrió en este trabajo.

Respecto a las muestras, los tejidos analizados son de tamaño reducido y debido a la naturaleza de los estudios microscópicos cada evaluación celular requiere de un nuevo corte de tejido. Como se mencionó previamente, considerando el pequeño tamaño de los tejidos a analizar, es posible que la composición del tejido linfóide se modifique sensiblemente entre los diferentes cortes, afectando la confiabilidad de los resultados obtenidos. Por tanto, sería necesario evaluar la menor cantidad de marcadores posibles, descartándose la necesidad de evaluar CD4 y CD8.

Si bien los tejidos fijados en SFZ no fueron utilizados para la caracterización del tejido linfóide de mucosas, los mismos se utilizaron como controles positivos de reactividad específica de los anticuerpos. En muchas oportunidades no se encuentra disponible un anticuerpo desarrollado o probado para ciertas especies animales. Sin embargo, suele haber reactividad cruzada debido a la relativa homología entre proteínas de especies relacionadas genéticamente. Cuando se quiere optimizar una detección inmunohistoquímica utilizando estos anticuerpos sobre tejidos fijados en formol nos enfrentamos, además de la incertidumbre respecto de la formación del complejo antígeno-anticuerpo, a las complicaciones impuestas por esta solución fijadora. Esto quiere decir que, ante resultados negativos, no es posible determinar si la ausencia de inmunomarcación se debe a la falta de reconocimiento del anticuerpo por el antígeno en esa especie o por el “enmascaramiento” del antígeno durante la fijación, no resuelta durante el proceso de RA. En este trabajo de tesis se utilizaron varios anticuerpos no evaluados en pequeños rumiantes según declaración del fabricante: un anti-CD21 (clon EP64, Bio-Rad), un anti-CD3 policlonal (CellMarque), un anti-CD68 (KP-1, Bio SB) y un anti-L1 (clon MAC387, Bio-Rad). En el caso del anti-CD21 (clon EP64) y el anti-CD68 (KP-1), no se observó inmunomarcación con ningún método de RA utilizado, pero tampoco se observó en los tejidos fijados con SFZ. Es por esto que ambos anticuerpos se consideraron como no específicos de ovinos.

El uso de una solución fijadora tiene como objeto principal conservar la morfología de los tejidos (y de los antígenos para el caso de ensayos de IHQ). El formaldehído es una

de las sustancias fijadoras más utilizadas y es por esto que en los laboratorios de patología se trabaja bajo condiciones de bioseguridad baja ya que, además de conservar los tejidos, el formol también inactiva a la mayoría de los patógenos infecciosos (Besarab et al., 1993). De esta manera, una vez fijada la muestra, la misma puede manipularse sin riesgo de transmisión de agentes al operador o al ambiente, solo conservándose el riesgo químico en la manipulación del formol. Para el caso de SFZ, no encontramos reportes que indiquen su actividad frente a microorganismos patógenos. Si bien podría suponerse que, al tener un efecto fijador tendría capacidad antimicrobiana, la misma no fue verificada. Considerando que el estudio de muestras de campo implica la posibilidad de trabajar con tejidos contaminados con agentes patógenos, debe considerarse el riesgo biológico asociado al uso de SFZ, hasta tanto no se confirme su capacidad desinfectante.

La detección de los marcadores celulares fue compleja. El procedimiento utilizado de rutina para evaluar numerosos antígenos utilizando RAIC con citrato pH 6 preparado en el laboratorio fue útil solo con un marcador (CD3), requiriéndose de un ajuste de la técnica específico para cada uno. Por ejemplo, en el caso de CD21, encontramos que el anticuerpo que resultó positivo a la inmunomarcación (clon CC21), lo hizo con una RAIC utilizando las versiones comerciales de *buffer* citrato pH 6 (Dako y Bio SB), y no con las formulaciones *in house*, sin importar el método de calentamiento evaluado. Se probaron combinaciones de diferentes concentraciones de citrato de sodio o ácido cítrico (de 10 a 100 mM) y Tween 20 (de 0,05% a 0,1%) sin resultados positivos. Otros autores que utilizaron el mismo anticuerpo (clon CC21) sobre tejidos fijados en formol también encontraron esta dificultad. Por ejemplo, Breugelmans et al., (2011) no observaron inmunomarcación utilizando *buffer* citrato mientras que Sigurdson et al. (2002) expresaron haber utilizado el *buffer* de recuperación antigénica de Dako logrando la detección por inmunofluorescencia en tejidos fijados en formol. Esto implicaría que algún componente o característica de las soluciones de RA comerciales (no declarada por los fabricantes) es indispensable para la RA de este antígeno en tejidos formolados.

Para el caso del anticuerpo anti-L1 (clon MAC387), la recomendación del fabricante indica recuperación antigénica con tripsina, sin aclarar otras condiciones. Por ello, se siguieron las indicaciones mencionadas por autores que obtuvieron marcación utilizando tripsina en la recuperación antigénica (Frost et al., 2000; Pérez et al., 1999). Bajo estas condiciones no se obtuvieron los resultados esperados, a pesar de observarse daños en la estructura de los tejidos característicos de la digestión enzimática, debiendo evaluarse procedimientos alternativos. Otros autores en publicaciones más recientes, mencionan haber tenido buenos resultados utilizando una RAIC con *buffer* citrato pH 6 (Bertolo et al., 2022; Wacinski et al., 2021) o RAIE con proteinasa K (J. H. Edwards et al., 2021; Vafaei et al., 2022), también probados sin éxito en el desarrollo de esta tesis. De los métodos de RA evaluados, se logró inmunomarcación utilizando RAIC con *buffer* Tris-EDTA pH 9. No se encontraron registros de la utilización de este *buffer* para la recuperación antigénica de células L1+

detectadas con el anticuerpo MAC387, aunque Nanney et al. (2008) también logran inmunomarcación utilizando una solución con pH alcalino (Tris-HCl pH 10). Si bien el procedimiento para detectar macrófagos con este anticuerpo no fue particularmente complejo, la evaluación del conjunto de los diferentes marcadores resulto trabajosa y demandante de insumos. Esto debería considerarse en futuros estudios ya que aumenta los tiempos de trabajo y eleva los costos.

Caracterización de las poblaciones celulares del TL de las muestras

Se observaron células CD3+ morfológicamente compatibles con linfocitos en una distribución principalmente perifolicular, de manera coincidente con lo reportado por otros autores en TLAM (Dagleish et al., 2012; Mahajan et al., 2005; Meek et al., 2022; Sedgmen et al., 2002). Asimismo, se observaron, en menor cantidad, células CD3+ dentro de los folículos de ovinos y caprinos. Autores que realizaron estudios inmunohistoquímicos en TLAM diferenciando las poblaciones de linfocitos T en CD4+ y CD8+ indican los linfocitos presentes en el interior de los folículos son en su mayoría CD4+. Sedgmen et al. (2002), al caracterizar el tejido linfoide de la mucosa rectal de los ovinos, encuentran una mayor presencia de células CD4+ tanto fuera como dentro de los folículos comparando con la población de células CD8+. Las mismas distribuciones fueron observadas en el TLAM rectal en bovinos (Mahajan et al., 2005) y en ciervos colorados (Dagleish et al., 2012). No encontramos registros de detección de linfocitos T en TLAC del tercer párpado en ovinos o caprinos sin patologías. Sin embargo, la distribución de células CD3+ coinciden con lo reportado en otros TLAM de rumiantes.

Con respecto a la marcación de células L1+ (monocitos, macrófagos y granulocitos), las mismas fueron detectadas en escaso número dentro de los folículos sin encontrar diferencias de edad o especie. Esto es coincidente con lo descrito por los desarrolladores del anticuerpo monoclonal utilizado (clon MAC387) (Flavell et al., 1987). Las células detectadas serían los macrófagos del interior de los folículos linfoides denominados "*tingible body macrophages*" (macrófagos de cuerpo teñible), los cuales son escasos y muestran una tinción débil coincidente con lo reportado por estos autores (Flavell et al., 1987). Por otro lado, se detectaron escasas células L1+ de la zona perifolicular mayormente cercanas al epitelio de la mucosa (epitelio asociado a folículos) que coincide con la ubicación de macrófagos reportado por otros autores, los cuales cumplirían función fagocítica en el tejido conectivo (Cesta, 2006; Liebler-Tenorio & Pabst, 2006; Meek et al., 2022).

El marcador celular CD21, también conocido como CR2, está presente en CDF y linfocitos B maduros cuya localización esperable en las muestras evaluadas, son los folículos linfoides (Naessens et al., 1990; Pringle et al., 2012). Los resultados de inmunomarcación de células CD21+ en las muestras de mucosa rectal de ovinos y caprinos coinciden con lo reportado por otros autores (Sedgmen et al., 2002). Las células marcadas se distribuyen principalmente en los folículos linfoides y escasamente por fuera de ellos. Lo mismo fue observado en otras especies como los bovinos (Mahajan et al., 2005) y los ciervos colorados (Dagleish et al., 2012).

Respecto al tejido linfoide asociado a mucosa de tercer párpado, no se han encontrado reportes de inmunomarcación de CD21 en tejidos de ovinos o caprinos. En las muestras evaluadas la marcación difiere de lo observado en la mucosa rectal de manera significativa ($p=0,002$), encontrando una proporción de folículos linfoides densamente empaquetados con escasa o nula presencia de células CD21+ (a un aumento de 40X). Esto fue también observado en el tejido linfoide asociado a mucosa nasofaríngea de bovinos (Meek et al., 2022). Teniendo en cuenta que los linfocitos B maduros se encuentran en los centros germinativos de los folículos secundarios, podría inferirse que estos folículos sean folículos primarios. Sin embargo, como se dijo previamente, CD21 también se expresa en las CDF que son constitutivas de los folículos linfoides, por lo cual sería de esperar la presencia de inmunomarcación en cualquier folículo. Si bien esto es cierto, otros autores también han descrito diferencias entre las CDF de folículos primarios y secundarios (Cyster et al., 2000; Kurshumliu et al., 2019). Se ha visto que la detección de CD21 y otros marcadores celulares presentes en CDF es mayor en los centros germinales de los folículos secundarios posiblemente debido a que están involucrados en la presentación de antígenos a los linfocitos B (Cyster et al., 2000). Incluso algunos autores proponen nombrar como “células estromales foliculares” (CEF) a las CDF de la periferia de los folículos por sus diferencias con las CDF del centro (Allen & Cyster, 2008). Aunque no presenten diferencias morfológicas apreciables (Imai & Yamakawa, 1996), estas células poseen una baja expresión de receptores de Fc (como CD23) o de receptores de complemento (como CD21) que son necesarios para la presentación de antígenos (Allen & Cyster, 2008; Kurshumliu et al., 2019). La baja presencia de CD21 en folículos primarios sumada a los límites de detección de la técnica de inmunohistoquímica pudieron haber dado una ausencia de marcación apreciable al microscopio óptico. Podría suponerse que la expresión de CD21 en el TLAM del tercer párpado sea menor que en otros TLAM en relación a una menor presencia de folículos linfoides con centro germinativo. Para determinar esto serían necesarios estudios adicionales

En relación con el diagnóstico antemortem de scrapie, la falta o escasez de células CD21+ en el tejido linfoide asociado a mucosa de tercer párpado podría influir en la utilidad de este tipo de muestra ya que se ha encontrado una relación entre la expresión de CD21 y PrP^C. En ovejas de genotipos susceptibles, la PrP^C se expresa con niveles más altos en el subconjunto de células CD21+ (Halliday et al., 2005) por lo que la expresión menor de CD21 también podría estar significando una expresión menor de PrP^C. A su vez, la expresión de PrP parece estar influenciada por el genotipo siendo mayor en el genotipo más susceptible (VRQ/VRQ) y menor en el menos susceptible (ARR/ARR) (Halliday et al., 2005). Esto indicaría que este tipo de muestras con baja expresión de CD21 podría no ser útil para el diagnóstico de scrapie. A pesar de la menor marcación de CD21 en el tejido linfoide de la mucosa de tercer párpado, esto no se vio en las muestras de mucosa rectal. Sería importante entonces, al considerar la aptitud diagnóstica de las muestras, la presencia de folículos linfoides con centro germinativo en las muestras y no solo el número total de folículos observados.

Conclusiones

- El tejido linfoide asociado a la conjuntiva no tendría gran desarrollo en el tercer párpado de ovinos y caprinos de las regiones evaluadas.
- El tejido linfoide asociado a la mucosa rectal de los ovinos se ubicaría principalmente adyacente a la unión mucocutánea, reduciendo su cantidad hacia craneal.
- La muestra recomendada para diagnóstico preclínico de scrapie sería la mucosa rectal debido a su mayor desarrollo de tejido linfoide y mayor presencia de células CD21+.
- La edad no fue un factor determinante en el desarrollo del tejido linfoide en los ovinos analizados. Bajo las condiciones definidas en este trabajo, no se encontraron diferencias en cantidad, aunque el criterio elegido podría haber influido en el resultado. Si bien no se tuvieron en cuenta diferentes ambientes, el sistema productivo podría tener influencia ya que los caprinos criados en encierre mostraron mayor desarrollo en su desarrollo. Se requieren estudios adicionales para confirmar este hecho.
- La técnica de IHQ fue de utilidad para la caracterización de poblaciones de células del sistema inmune. El método de análisis propuesto permitió determinar diferencias entre los tejidos analizados.
- Existieron diferencias en la detección de CD21 entre el TL de las mucosas evaluadas, encontrando una proporción de folículos linfoides densamente empaquetados con escasa o nula presencia de células CD21+ en las muestras de tercer párpado.
- Debido a las diferencias encontradas y la importancia de la presencia de CDF (CD21+) para la acumulación de PrP^{Sc} en el TL de los animales infectados, debería considerarse la presencia de centros germinativos en la determinación de la aptitud diagnóstica de las muestras para el diagnóstico de scrapie.

Capítulo 3

Introducción

Existen procedimientos para la detección de PrP^{Sc} mediante diferentes metodologías. Para ello se utilizan insumos importados, muchos de los cuales han sido discontinuados en el mercado. Por lo tanto, actualmente los mismos no pueden conseguirse debiendo adaptarse los procedimientos de investigación y diagnóstico de las EET a los insumos disponibles. En el presente trabajo nos propusimos estudiar el desarrollo del tejido linfoide en mucosas en conjunto con la presencia de PrP. Contar con un producto de origen nacional capaz de detectar sus formas normal y patogénica facilitaría estas actividades y ahorraría recursos en estudios futuros. En este sentido, se propuso la obtención de un anticuerpo anti-PrP y el desarrollo de procedimientos de IHQ y WB capaces de detectar las formas celular y patogénica de la proteína priónica.

El uso de gallinas ponedoras en la producción de inmunoglobulinas mediante la tecnología IgY permite la obtención de anticuerpos específicos en abundancia, comparando con los sistemas que lo hacen en mamíferos. Se puede producir aproximadamente 17–35 g de IgY total/año a partir de una sola gallina, de los cuales se puede esperar que 1–10 % sea específico para el antígeno (Schade et al., 2005). Además, el uso de la tecnología IgY tiene ventajas en cuanto al bienestar animal porque permite una extracción no invasiva de los anticuerpos (recolección de huevos), lo que es menos estresante y traumático para los animales en comparación con los métodos tradicionales de producción de anticuerpos (Schade et al., 2005). Esto reduce la necesidad de sacrificar animales y está en conformidad con los principios de las 3 Rs del bienestar animal de Russell y Burch: reducir, refinar y reemplazar (Tannenbaum & Bennett, 2015).

Existen en el mercado varios anticuerpos anti-PrP producidos en diferentes especies animales, requiriéndose de diversas estrategias de producción debido a que, por la elevada homología de PrP entre las especies animales, la misma puede ser poco inmunogénica. Los mamíferos suelen ser tolerantes a su propia PrP homóloga y a cualquier sitio homólogo en la PrP de otras especies (Rubenstein et al., 1999). La producción de anticuerpos en especies filogenéticamente distantes a la especie de interés minimizaría la inmunotolerancia y facilitaría la producción de anticuerpos. Por este motivo, pueden producirse anticuerpos contra proteínas de mamíferos conservadas de manera más eficiente que en otros animales como los conejos (Larsson & Sjöquist, 1990). En este caso, la proteína priónica es altamente conservada en mamíferos existiendo una homología de aproximadamente entre un 88-93% entre conejos, ratones, ovinos, humanos, hámsteres y visones (Rubenstein et al., 1999). En cambio, comparando con la proteína priónica de las aves se ha observado una homología de 55% aproximadamente (Gabriel et al., 1992). Así, la distancia filogenética que existe entre las aves y mamíferos sería una ventaja de la tecnología IgY por sobre otras estrategias de producción de anticuerpos. Por lo tanto, se propuso la producción de anticuerpos IgY anti PrP^C ovino para detección de PrP^C y PrP^{Sc} en tejidos animales.

Materiales y métodos

La estrategia seguida para la producción de anticuerpos anti PrP^C se resume a continuación:

-Producción de una PrP^C ovina recombinante (PrP^Crec): para esto se diseñaron primers específicos para amplificar la región codificante de la proteína PrP^C mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del genoma de un ovino. El segmento amplificado se clonó en un vector de clonado (*pGEM-T*) y luego se subclonó en un vector de expresión (*pRSET*). La expresión se llevó a cabo en un sistema procariota (*Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS). La proteína obtenida fue reconocida por anticuerpos comerciales anti-PrP (clon 6H4) mediante inmunotransferencia (*Western blot*) y fue sensible a la proteinasa K.

-Inoculación de PrP^Crec ovina en gallinas ponedoras: la PrP^Crec ovina se purificó mediante una resina quelante de níquel. Luego fue inoculada en gallinas ponedoras 3 veces cada 21 días utilizando adyuvante de Freund completo e incompleto. Luego se recolectaron los huevos a partir del día 52.

-Obtención de anticuerpos anti-PrP^C: los anticuerpos fueron purificados a partir de los huevos recolectados mediante precipitación con sulfato de amonio. Luego fueron adsorbidos con una suspensión de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS para eliminar anticuerpos inespecíficos.

-Caracterización de los anticuerpos obtenidos: la inmunoreactividad de los anticuerpos obtenidos fue analizada mediante inmunotransferencia (*Western blot*) utilizando la PrP^Crec ovina producida.

-Detección de PrP^{Sc} a través de IHC utilizando IgY anti-PrP^C: se utilizaron los anticuerpos IgY como anticuerpos primarios en la técnica de IHQ en tejidos provenientes de bovinos con EEB y un ovino con scrapie dando resultados positivos.

Producción de PrP^C ovina recombinante

Toma de muestras de sangre

Para la amplificación del gen *PRNP*; se tomó una muestra de sangre (2 ml) de un ovino mediante punción de la vena yugular y de un bovino a partir de la vena coccígea utilizando una jeringa de 10 ml y aguja hipodérmica (21G).

Diseño de cebadores

Se diseñaron cebadores específicos para amplificar la secuencia codificante de la PrP^C en base al gen *PRNP* de la oveja ya que la región codificante se encuentra en sólo un exón (número de acceso en *GenBank*: U67922.1). En el diseño se adicionaron sitios de restricción de las enzimas *XhoI* y *HindIII* para el posterior clonado (ver tabla 7).

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Sitio de Restricción
Cebador sentido	CTCGAG GCTGACACCCTCTTATTTGCA	XhoI
Cebador antisentido	AAGCTT TTAACCTGGCAAAGATTAAGAAGATAATGA	HindIII

Tabla 7. Cebadores específicos para amplificar la secuencia codificante de la PrP^C.

Extracción del ADN genómico ovino

La extracción del ADN genómico ovino y bovino se realizó a partir de una muestra de sangre entera utilizando el kit de extracción *ADN PuriPrep S-Kit* (Inbio Highway) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído se conservó a -20°C hasta su uso.

Amplificación de la región codificante del gen PRNP ovino

La amplificación se llevó a cabo mediante PCR según el siguiente protocolo:

Reactivo	Volumen por reacción (µl)
H ₂ O	14,875
Buffer GoTaq (5X)	5
Cebador sentido	1,25
Cebador antisentido	1,25
dNTPs	0,5
Taq polimerasa (Promega)	0,125
ADN	2
Total	25

El programa utilizado en el termociclador para la presente PCR fue:

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo	N.º de Ciclos
<i>Desnaturalización Inicial</i>	95	2 min	1
<i>Desnaturalización</i>	95	30 seg	30
<i>Alineamiento</i>	58	30 seg	
<i>Extensión</i>	72	1 min	
<i>Extensión final</i>	72	5 min	1

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *E. coli* DH5 α para el clonado y *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) para la producción de proteínas recombinantes. Se crecieron en caldo LB (Triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 10 g, agua destilada hasta llegar a 1 litro) o agar LB (15 g de agar en 1 litro de caldo LB), con ampicilina (100 μ g/ml) cuando fue necesario, a 37 $^{\circ}$ C.

Todas las cepas de *E. coli* se conservaron a -70 $^{\circ}$ C en caldo LB-glicerol 30 %.

Clonado en el vector pGEM-T

Los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante del kit ADN PuriPrep-GP (Inbio Highway) y luego ligados en el vector *pGEM-T Easy* (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este es un vector abierto que contiene una timina agregada en sus extremos 3' que permite ligarse con las adeninas protruyentes que deja la *Taq* polimerasa en los extremos 3' de los amplicones (ver figura 19). Los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 flanquean una región de clonación con múltiples sitios de restricción dentro de la región codificante de la β -galactosidasa (ver figura 18). La inserción del amplicón en esta zona permite que los clones recombinantes se identifiquen directamente mediante la detección azul/blanca en las placas de agar LB/ampicilina. Luego se transformaron *E. coli* DH5 α con el plásmido recombinante (*pGEMT-PRNPov*) y se realizó una selección de colonias con ampicilina, isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal). Se seleccionaron colonias blancas y la presencia del inserto fue verificada mediante PCR y secuenciación en la Unidad Genómica del CICVyA-INTA.

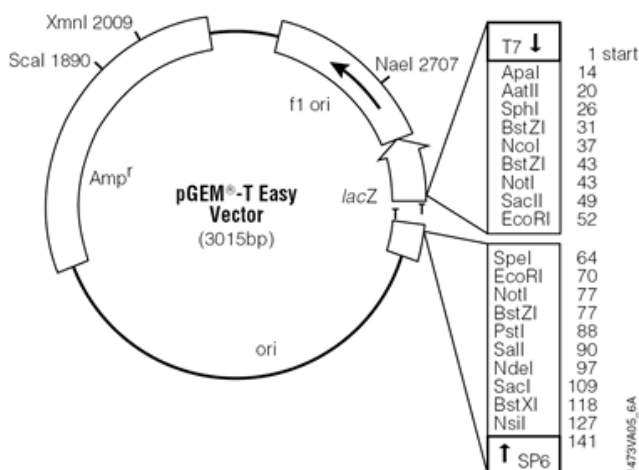


Figura 18. Esquematación del vector *pGEM-T Easy*.

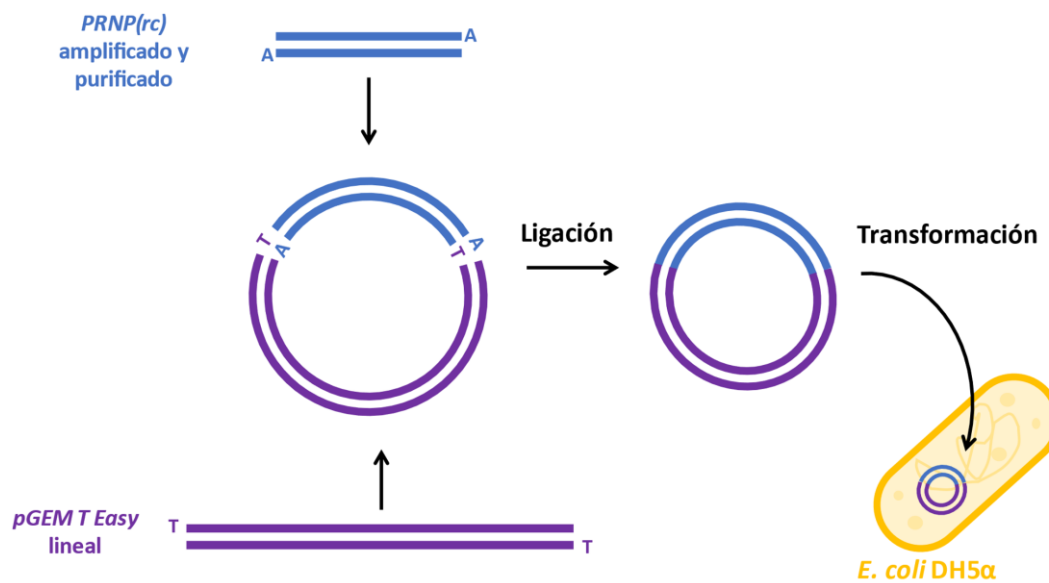


Figura 19. Esquematación del clonado utilizando el vector *pGEM-T Easy*. PRNP(rc): región codificante del gen *PRNP*.

Preparación de células competentes de E. coli

Se siguió el método modificado de Sambrook et al. (1989) Se tomaron 0,25 ml de un cultivo de 16 horas y se inocularon en 25 ml de caldo LB. Se dejó crecer en agitación a 37 °C hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,48 (2,5 horas aproximadamente). Se colocó el cultivo en hielo 15 minutos, posteriormente se centrifugó 10 min a 5000 rpm, 4 °C. Se resuspendieron suavemente las células en 10 ml de medio RF1 estéril (KCl 100 mM; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 mM; Acetato de K, 30 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mM; Glicerol 15%, pH = 5,8) y se incubó 5-10 minutos en hielo. Luego se centrifugó 10 minutos a 5000 rpm, 4°C y se resuspendieron las células en 1 ml de medio RF2 (KCl 10 mM; MOPS o PIPES 10 mM; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 75 mM; Glicerol 15%; pH=6,5) previamente enfriado y estéril. Se incubaron 10 minutos en hielo y se guardaron en alícuotas de 50 μ l a -70 °C hasta su utilización.

Transformación de células competentes

Para la transformación, se descongelaron las células en hielo, se mezclaron inmediatamente con 5 μ l de ADN plasmídico y se incubaron a 4 °C por 30 minutos. Luego se dio un choque térmico a 42 °C durante 60 segundos; y se dejó en hielo 1-2 minutos. Posteriormente se agregaron 0,9 ml de caldo LB y se incubó 1 hora a 37 °C en

agitación. Se sembraron en placas de agar LB con el agregado de los reactivos adecuados para seleccionar las bacterias transformadas. Para el clonado en *pGEM-T Easy* se utilizaron placas con 100 µg/ml de ampicilina, sobre las cuales se habían esparcido 100 µl de una solución 100 mM de IPTG (Genbiotech) y 20 µl de una solución 50 mg/ml de X-Gal (Promega).

Extracción de plásmidos de E. coli por lisis alcalina

Se siguió el método modificado de Birnboim (1983). Esta técnica se basa en un cambio brusco de pH pasando de una etapa de ruptura celular y desnaturalización del ADN (con una solución de lisis a pH 12,5), a una de neutralización y precipitación del ADN cromosómico desnaturalizado junto a proteínas y restos celulares (con una solución de acetato de potasio a pH 4,8). Las dos hebras de ADN plasmídico desnaturalizadas permanecen enlazadas una con la otra. En un paso posterior de centrifugación, el ADN plasmídico, ya renaturalizado, se mantiene en solución mientras que el resto forma un pellet. Se tomó 1,5 ml de un cultivo de 18 h, se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió en 100 µl de *buffer* TEG (tris 25 mM, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM) y se dejó 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se mezclaron con movimientos suaves. Se dejó en hielo 5 minutos. Se agregaron 150 µl de acetato de potasio 3 M pH 4,8; se mezcló por inversión hasta obtener una mezcla homogénea y se llevó a hielo 5 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C y se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó un volumen de alcohol isopropílico al sobrenadante y se dejó a temperatura ambiente 20 min; con frecuentes inversiones. Se centrifugó 10 minutos a 13000 rpm a 4 °C, se lavó con etanol 70 %; se centrifugó a 13000 rpm 3 minutos y se dejó secar. Se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8) o agua destilada.

Electroforesis en geles de agarosa

Las corridas electroforéticas de los plásmidos provenientes de *E. coli* se realizaron a 65 V/cm² durante 90 min utilizando una concentración de agarosa de 0,8 % en buffer TAE 1X empleando cubas de electroforesis (Bio-Rad) y fuente de poder (Bio-Rad). Para productos de PCR se utilizaron geles de agarosa 1 %, en buffer TAE 1X y las corridas electroforéticas se realizaron a 75 V/cm² utilizando los mismos equipos. Los geles en ambos casos fueron teñidos con bromuro de etidio 10 mg/ml (Sambrook et al. 1989). Los resultados se analizaron con el sistema de documentación de geles UVIdoc (Uvitec).

Composición del buffer de corrida TAE (50X): Tris base 242 g, ácido acético glacial 57,1 ml, EDTA 0,5 M (pH 8) 40 ml, agua destilada esterilizada hasta llegar a 1000 ml. La solución 1X se preparó diluyendo el buffer 50X en agua destilada.

Marcadores de peso molecular: para determinar el tamaño de plásmidos y fragmentos de PCR en geles de agarosa se utilizó el marcador Ladder 1 kpb plus (Productos Bio-Lógicos).

Subclonado en el vector *pRSET-B*

Para esto se digirió el vector *pGEMT-PRNPov* con las endonucleasas de restricción *XhoI* y *HindIII* (Promega). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el vector digerido y se purificó la banda de correspondiente al inserto (*PRNPov*) por medio del kit ADN PuriPrep-GP (Inbio Highway). El *PRNPov* purificado fue ligado en *pRSET-B* (ver figura 20) previamente digerido con *XhoI* y *HindIII*. Este vector tiene la capacidad de producir una gran cantidad de proteínas, controlada por el promotor del bacteriófago T7. Además, cuenta con el agregado de un segmento de 6 histidinas consecutivas en el extremo Nterminal de la proteína producida. Este segmento de polihistidinas sirve luego para la identificación y la purificación del producto logrado.

La construcción (*pRSET-B-PRNPov*) se utilizó para transformar *E. coli* DH5 α y BL21 (D3) pLysS por el método antes descrito. Las colonias que resultaron positivas para el subclonado, fueron confirmadas por digestión con enzimas de restricción y secuenciación. Esta metodología se resume en la figura 21.

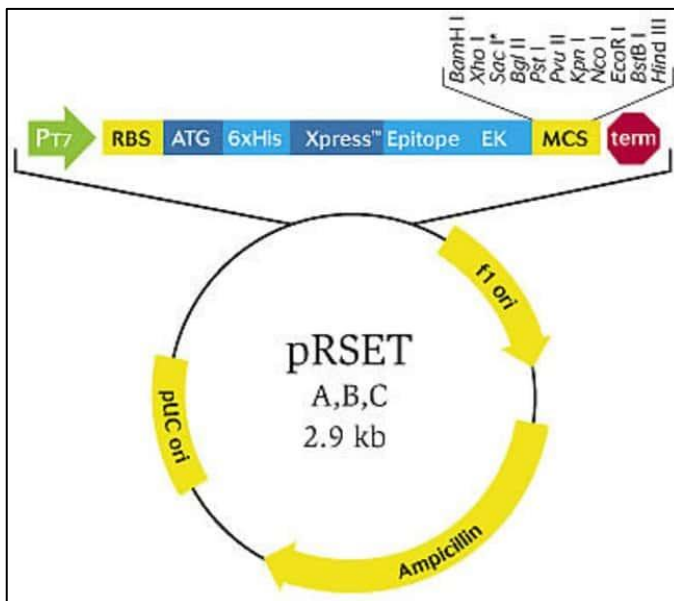


Figura 20. Esquemización del vector de expresión *pRSET-B*.

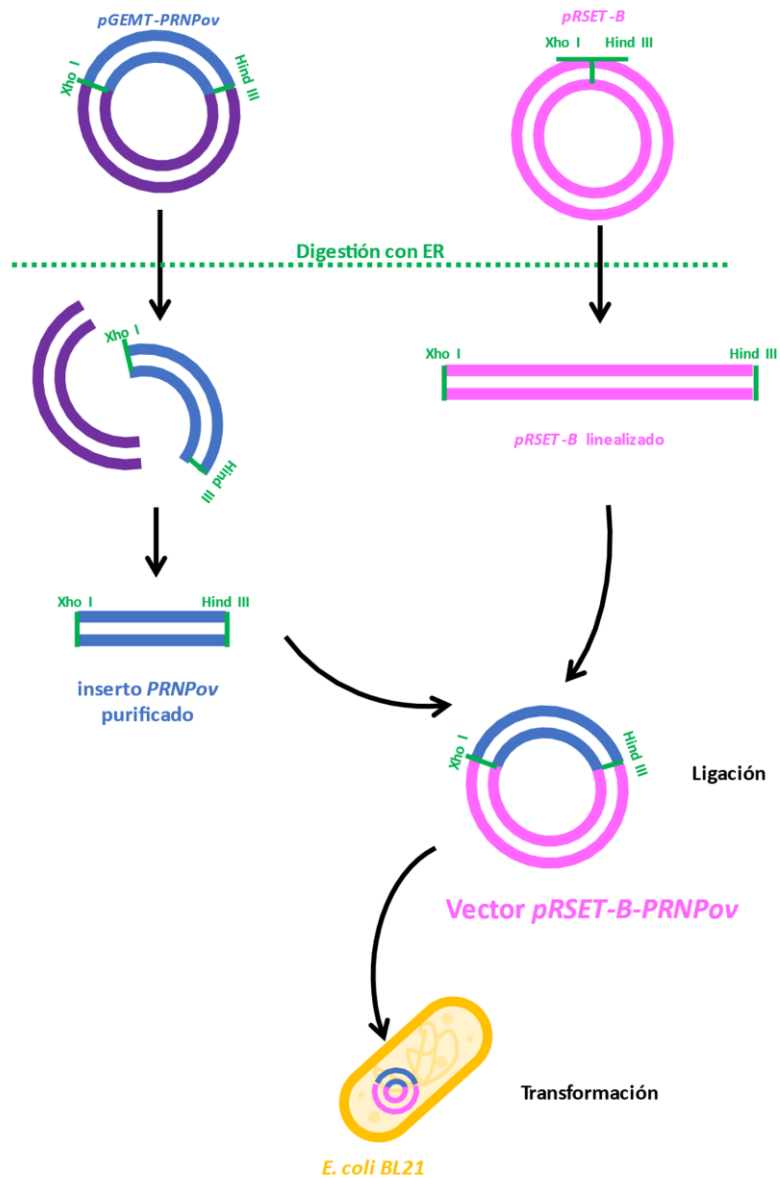


Figura 21. Esquematización del subclonado utilizando el vector *pRSET-B*. ER: enzimas de restricción.

Digestión con Enzimas de Restricción

Para un volumen final de 20 μ l, se mezclaron los reactivos detallados en la tabla 8. Se incubó la mezcla 2 horas. Para el caso de *Hind*III y *Xho*I, es posible hacer tanto digestiones sucesivas como una doble digestión a 37 ° C.

<i>Reactivos</i>	<i>Volumen</i>
<i>Buffer B 10X (Promega)</i>	2 μ l (1/10 de vol. final)
<i>ADN^a</i>	4 μ l
<i>Albumina sérica bovina^b</i>	0,2 ml
<i>Enzima de restricción</i>	0,3 μ l
<i>Agua destilada estéril</i>	3,5 μ l

Tabla 8. Reactivos y volúmenes sugeridos para la digestión con enzimas de restricción.

a: según la concentración en que se encuentre el ADN.

b: según lo indicado por el fabricante de la enzima.

Ligación

Para unir los fragmentos de ADN y con el vector *pRSET-B* cortados con XhoI y HindIII se utilizó la ligasa del bacteriófago T4 (Promega) tomado en cuenta las recomendaciones del fabricante en cuanto a la relación molar vector:inserto. Se incubó 18 horas a 16°C.

Verificación de la construcción pRSET-B-PRNPov

La construcción *pRSET-B-PRNPov* fue verificada mediante PCR y digestión enzimática con XhoI y HindIII observándose las bandas del tamaño esperado luego de una electroforesis en gel de agarosa.

Expresión de PrP^C rec ovina

Las cepas de *E. coli* BL21 (D3) pLysS portantes de la construcción *pRSET-B-PRNPov* se cultivaron a 37°C en caldo LB con el agregado de ampicilina (100 μ g/ml). Al día siguiente se realizó una dilución 1/50 de este cultivo en caldo LB/ampicilina fresco y se creció de manera similar hasta alcanzar una $DO_{600}=0,6-0,8$. En ese momento fueron inducidos con IPTG (1 mM) durante 16 horas reservándose 1 ml como control sin inducir, ambos cultivos se incubaron a 37°C durante 16 horas. Luego, los cultivos se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm y se descartó el sobrenadante.

Preparación del lisado celular

Se equilibró la solución de lisis (cloruro de guanidina 6 M; fosfato de sodio 20 mM; NaCl 500mM; sarkosyl 0,2%; pH 7,8) a 37 °C. Se lisaron las bacterias con la solución de lisis en agitación suave, 1 h a temperatura ambiente. Se utilizaron 5 ml de solución de lisis por cada gramo de peso húmedo del pellet. Se sonicó el lisado celular, en hielo, con tres pulsos de 5 segundos a intensidad alta. Se centrifugó el lisado celular (10000 x g, 15 min, 4 °C). Se descartó el precipitado.

Preparación de la columna de purificación

Se resuspendió la resina quelante de níquel *ProBond* (ThermoFisher) invirtiendo suavemente, varias veces, su envase contenedor. Se colocaron 2 ml de resina en una columna de purificación de 10 ml y se dejó que se asentara por gravedad (5-10 minutos). Se extrajo cuidadosamente el sobrenadante. Se agregaron 6 ml de agua destilada estéril y se resuspendió la resina por inversión suave de la columna. Se permitió que la resina se asentara y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 6 ml de *buffer A* (8 M urea; 0,1 M Na₂HPO₄; 10 mM Tris-HCl, pH 8). Se resuspendió la resina. Se permitió que la resina se asiente y se eliminó el sobrenadante. Se repitió el lavado con *buffer A* una vez más.

Purificación de la PrP^Crec ovina

Para la purificación de la PrP^Crec ovina se probaron 3 métodos utilizando la resina *ProBond* (ThermoFisher):

a) Procedimiento en condiciones desnaturalizantes. Siguiendo las recomendaciones del fabricante con el agregado de sarkosyl 0,2% al *buffer* de lisis.

b) Procedimiento híbrido (desnaturalizante y nativo). Siguiendo las recomendaciones del fabricante con el agregado de sarkosyl 0,2% al *buffer* de lisis.

c) Procedimiento descrito por Vrentas et al. (2012). Se lisaron las bacterias recombinantes inducidas luego de 18 hs a 37°C con *buffer* de lisis (6 M cloruro de guanidinio; 20 mM fosfato de sodio, pH 7,8; 500 mM NaCl; sarkosyl 0,2%, 20 mM 2-mercaptoetanol) y sonicación. Luego se incubó con resina *ProBond* (ThermoFisher) por 30 minutos en agitación. Se realizaron 4 lavados con *buffer A* (8 M urea; 0,1 M Na₂HPO₄; 10 mM Tris-HCl, pH 8) y la PrP^Crec se eluyó con *buffer L* modificado (8 M urea; 10 mM Tris-HCl, 0,3 M imidazol, pH 8).

d) Procedimiento descrito por Vrentas et al. (2012) con modificaciones. Se lisaron las bacterias recombinantes inducidas luego de 18 hs a 37°C con *buffer* de lisis (6 M cloruro de guanidinio; 20 mM fosfato de sodio, pH 7,8; 500 mM NaCl; sarkosyl 0,2%) y sonicación. Luego se incubó con resina *ProBond* (*ThermoFisher*) por 30 minutos en agitación. Se realizaron 4 lavados con *buffer A* (8 M urea; 0,1 M Na₂HPO₄; 10 mM Tris-HCl, pH 8) y la PrP^Crec se eluyó con *buffer L* modificado (10 mM Tris-HCl, 0,3 M imidazol, pH 8).

Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analizar el perfil de las proteínas, se realizó una electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 % en condiciones reductoras. Las muestras de proteínas fueron diluidas en *buffer* de carga (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 20%) e

incubadas durante 5 minutos a 100°C. La corrida electroforética fue realizada a un voltaje constante de 70 V durante 20 minutos, y a 120 V constante durante 1 hora.

Marcador de proteínas: se utilizó el marcador de proteínas preteñido *Blue Plus Protein Marker* de 14-100 kDa (Trans) y *BLUltra Prestained Protein Ladder* de 6,5 a 270 kDa (Genbiotech).

Tinción de azul brillante de Coomassie

Luego de la electroforesis los geles fueron sumergidos en una solución de tinción con el reactivo azul brillante de Coomassie al 0,125 % durante 1 hora. Posteriormente, los geles fueron desteñidos con una solución de metanol al 50 % p/v y ácido acético al 10 % p/v. Para el análisis del perfil proteico se utilizó el equipo Gel Doc XR + (Bio-Rad).

Inmunotransferencia (Western blot)

Luego de efectuada la electroforesis, se transfirieron las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 250 mA durante 1,5 horas en *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20%).

La transferencia de proteínas a la nitrocelulosa se verificó por tinción con rojo Ponceau 0,1% (en ácido acético 5%).

Luego de la transferencia, las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo PBS-Tween (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4; Tween 20 0,05%) con el agregado de 5% de leche descremada. Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado PBS-Tween y se incubaron con diluciones apropiadas (según el fabricante) de los anticuerpos primarios (anti-cola de histidina [Bio-rad] y anti-PrP [Prionics]) en *buffer* de dilución PBS-Tween con el agregado de 3% de leche descremada. Luego de 2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, las membranas se lavaron 3 veces con solución de lavado PBS-Tween y posteriormente fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa (Trans) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-Tween y fueron reveladas utilizando DAB (10 ml de Tris-HCl 0,05 M, pH 7,4; DAB 10 mg y 6,4 µl de H₂O₂) hasta visualizar las bandas.

Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se realizó mediante el método estándar de Bradford (1976) utilizando un kit comercial (Bio-Rad) según las instrucciones del fabricante. Las muestras se colocaron en microplacas de 96 wells (10 µl de cada muestra/well) y se agregaron 200 µl del reactivo de Bradford diluido 1:5 en agua destilada. Para medir la absorbancia se utilizó un espectrofotómetro.

Para calcular correctamente la concentración correspondiente a la PrP^Crec ovina se ajustaron los resultados del método de Bradford con los porcentajes obtenidos a partir del análisis de geles de poliacrilamida con el programa ImageJ.

Prueba de sensibilidad a la proteinasa K

Para caracterizar la PrP^Crec generada se determinó su sensibilidad a la PK utilizando 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 500 µg/ml de PK. La incubación se realizó a 37°C por 1 hora. Como control positivo se utilizó la PrP^Crec ovina producida sin digerir y como control negativo se utilizó PK a una concentración de 500 µg/ml sin el agregado de la PrP^Crec. Posteriormente, cada producto de la digestión fue separado por electroforesis (SDS-PAGE) para su visualización y también se les realizó una inmunotransferencia (*Western blot*) para identificar la presencia de PrP^Crec con anticuerpos específicos anti-PrP (*Prionics*, clon 6H4).

Producción de anticuerpos de yema de huevo (IgY) anti PrP^Crec

Inoculación de gallinas ponedoras con la PrP^Crec ovina

Para la producción de IgY se utilizaron 2 gallinas ponedoras (*Gallus gallus domesticus*) de entre 16 y 22 semanas de vida con un peso aproximado entre 1.800 y 2.400 g. Se inmunizaron con la PrP^Crec ovina purificada en 3 inoculaciones separadas por un lapso de 21 días, según el esquema de inmunización propuesto por Schade et al. (2005). Para la primera inmunización la PrP^Crec se emulsionó con adyuvante completo de Freund (AFC) (Sigma-Aldrich), mientras que para las inmunizaciones siguientes se utilizó adyuvante incompleto de Freund (AFI) (Sigma-Aldrich). El inmunógeno se elaboró en una proporción 50/50 (antígeno y AFC o AFI respectivamente). En la primoinmunización, las aves fueron inoculadas con 0,5 ml del inmunógeno por vía subcutánea y las inmunizaciones subsiguientes fueron por vía intramuscular. Para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra la PrP^Crec en suero y yema se extrajeron muestras de sangre 7 días luego de cada inmunización a partir de la vena alar y se recolectaron huevos durante 10 días después de la tercera inmunización (ver figura 22).

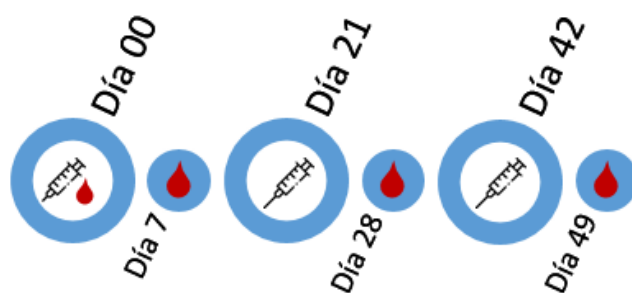


Figura 22. Esquema de inmunización. Inoculación de inmunógeno los días 0, 21 y 42. Extracción de sangre los días 0, 7, 28 y 49. A partir del día 52 se recolectaron los huevos.

Detección de anticuerpos anti-PrP^{rec} en el suero de las gallinas inoculadas

Para determinar la presencia de anticuerpos anti-PrP en el suero de las gallinas inmunizadas se llevó a cabo un ensayo de dot blot. Se inmovilizó 1 µl de distintas diluciones en PBS de PrP^C rec ovina (de 1:2 a 1:32) sobre tiras de membrana de nitrocelulosa. Como control negativo se utilizó PBS. Las membranas fueron bloqueadas con PBS-T-Leche 5% y luego incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora con una dilución 1:1000 en PBS-T del suero extraído de las gallinas los días 0 (T0), 28 (T2) y 49 (T3). Finalmente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-IgY conjugadas con peroxidasa (diluida 1:5.000 en PBS-T) y reveladas con una solución del sustrato cromógeno DAB para observar la aparición de color. La reacción fue detenida sumergiendo las membranas en agua destilada.

Extracción de anticuerpos de yema de huevo (IgY)

La extracción de anticuerpos IgY a partir de los huevos recolectados se realizó mediante el método de precipitación con sulfato de amonio según metodologías previamente descritas y con modificaciones (Akita y Nakai 1992). Para esto, las yemas de los huevos fueron separadas de la clara en forma manual con un dispositivo separador. Posteriormente, las yemas se hicieron rodar sobre un papel absorbente para eliminar los restos de clara que podrían haber quedado adheridos a la membrana vitelina. El contenido de las yemas fue extraído mediante punción la membrana y recolectado en probetas para determinar el volumen del mismo. Las yemas fueron diluidas 1:5 en agua destilada y, luego de su homogeneización, fueron congeladas a -20°C durante al menos 48 h. Para realizar la extracción de las IgY, las yemas diluidas fueron descongeladas a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 8.000 g a 4°C durante 10 min. Se descartó el pellet lipídico y el sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro para eliminar restos de lípidos de la fracción acuosa. Se midió el volumen del filtrado resultante y fueron agregados 0,24 g/ml de sulfato de amonio en agitación constante a temperatura ambiente por 10 min. Luego de su centrifugación a 10.000 g a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en una solución de sulfato de amonio 2 M, que fue centrifugada como en el paso anterior. Finalmente, el pellet resultante fue resuspendido en 15 o 20 partes del volumen inicial en solución fisiológica, y colocado dentro de membranas de diálisis con un punto de corte de 14 kDa (Sigma-Aldrich). Las bolsas de diálisis fueron sumergidas en solución fisiológica mantenidas a 4°C y renovándola al menos 3 veces. Para garantizar la correcta eliminación del sulfato de amonio, se utilizó el método con BaCl₂ que permite la detección de grupos sulfato. Este método no tiene gran sensibilidad, pero es capaz de detectar hasta 0,03 % p/v de sulfato de amonio. Una vez eliminado el sulfato de las muestras, se agregó 0,01 % p/v de timerosal con el fin de evitar contaminaciones microbianas. Finalmente, los extractos de IgY fueron conservados a 4°C hasta su uso.

Adsorción del extracto de IgY con E. coli BL21

Para eliminar aquellos anticuerpos no específicos presentes en el extracto de IgY se llevó a cabo un proceso de adsorción con *E. coli* BL21. Para ello, el extracto de IgY anti-PrP^Crec ovina se enfrentó a una suspensión de *E. coli* BL21 en PBS (OD₆₀₀=2,0) en una dilución 1:2 y 1:10. Se incubó a 42°C por 2 horas según el procedimiento modificado de van Der Ploeg et al. (2015).

Determinación de la inmunoreactividad de la IgY anti PrP^Crec ovina

En primer lugar, se realizó la electroforesis de la PrP^Crec ovina en un gel al 12 % de poliacrilamida en condiciones reductoras según la metodología descrita anteriormente y se determinó la inmunoreactividad de las IgY mediante inmunotransferencia. Para esto, luego de la transferencia, las membranas con las proteínas separadas e inmovilizadas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora con una dilución 1:1.000 de sueros o extractos de IgY anti-PrP^Crec ovina diluido en PBS-T. Después de 3 lavados, las membranas se incubaron con anticuerpos de conejo anti-gallina (Sigma-Aldrich) conjugados con peroxidasa (diluido 1:5.000 en PBS-T) y, posteriormente, se agregó una solución de sustrato cromogénico DAB con el fin de observar la presencia de bandas de reconocimiento.

Diagnóstico de scrapie mediante IHC

El diagnóstico se realizó sobre las muestras de mucosa rectal que resultaron aptas (con 6 o más folículos linfoides observados en microscopio óptico) o sobre muestras de SNC (óbex) de aquellos animales cuyas muestras de mucosa no fueran aptas. Se utilizó el procedimiento empleado de rutina para diagnóstico de scrapie. Brevemente, una vez incluidas en parafina las muestras, se cortaron secciones de tejido de 2-3 µm de espesor y se montaron sobre portaobjetos positivados. Luego del desparafinado en xileno y alcoholes de graduación decreciente (100%, 96%, 80%), los cortes se sumergieron en peróxido de hidrogeno al 3% en metanol para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. A continuación, los cortes se sumergieron en ácido fórmico al 98% por 5 minutos y luego por una solución de Tris-HCl (10 mM, pH 7,6). La recuperación antigénica se realizó en buffer citrato (citrato de sodio 10 mM, pH 6) por 20 minutos en horno microondas y luego de este proceso, las muestras fueron tratadas con PK por 2 minutos a temperatura ambiente.

Como anticuerpo primario se utilizaron anticuerpos monoclonales hecho en ratón (Prionics, clon 6H4 dilución 1:1000 y VMRD, clon 99.97 dilución 1:2000). La reacción antígeno-anticuerpo fue revelada mediante el sistema *Envision* (Dako), utilizando DAB como sustrato cromógeno.

Como control positivo se utilizaron muestras de SNC de bovinos con EEB y un ovino con scrapie fijados en formol al 10%, %, gentilmente cedidos por laboratorios de referencia de la OMSA para EEB y scrapie (*Canadian Food Inspection Agency* y la

University of Bern). Como control negativo se utilizaron muestras de SNC de bovinos y/u ovinos sin signología nerviosa provenientes de Argentina.

Detección de PrP^{Sc} a través de IHC utilizando IgY anti-PrP^C

Se utilizó el mismo procedimiento anterior (*Diagnóstico de scrapie mediante IHC*), pero como anticuerpos primarios se utilizaron las IgY adsorbido con *E. coli* BL21 en una dilución 1:1000 y anticuerpos monoclonales comercialmente disponibles hecho en ratón (Prionics, clon 6H4 dilución 1:1000 y VMRD, clon 99.97) como control positivo. En el caso de los anticuerpos IgY anti-PrP se utilizó un IgG anti-gallina conjugado HRP (Thermofisher) como anticuerpo secundario, y DAB como sustrato cromógeno. En el caso del anticuerpo 6H4, la reacción antígeno-anticuerpo fue revelada mediante el sistema *Envision* (Dako), utilizando DAB como sustrato cromógeno.

Como control negativo del anticuerpo primario se utilizaron muestras de bovinos sin sintomatología nerviosa y como control negativo del anticuerpo secundario se siguió el mismo procedimiento sin aplicar anticuerpo primario.

Detección de PrP^C a través de IHC utilizando IgY anti-PrP^C

Se realizó la misma metodología descrita para la detección por IHQ de los marcadores celulares. Se probaron diferentes métodos de RAIC:

Método de calor húmedo en horno de microondas (15-30 minutos) con las siguientes soluciones:

- Buffer citrato pH 6 (ácido cítrico 10 mM, 0,05 % de tween 20).
- Solución *ImmunoDNA Retriever Citrate* (Bio SB).

Método de calor húmedo en olla a presión (15-30 minutos) con las siguientes soluciones:

- Buffer citrato pH 6 (ácido cítrico 10 mM, 0,05 % de tween 20).
- Solución *ImmunoDNA Retriever Citrate* (Bio SB).

Para la optimización de la detección se utilizaron muestras de tejido linfóide de ovinos fijados en formol al 10% y en SFZ.

Resultados

Amplificación y clonado del gen *PRNP*

Se logró amplificar la región codificante del gen *PRNP* que codifica para la PrP^C a partir del ADN extraído de una muestra de sangre de ovino y de bovino por la técnica de PCR. Los productos amplificados fueron purificados y se utilizaron para ligarlos al vector *pGEM-T Easy* (ver figura 23). Posteriormente el inserto correspondiente al ovino fue subclonado en el vector *pRSET-B* utilizando las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*, y la proteína fue expresada en la cepa de *E. coli* BL21 (DE) pLysS. Los resultados de las secuenciaciones de los amplicones producidos se encuentran en el anexo de esta tesis.

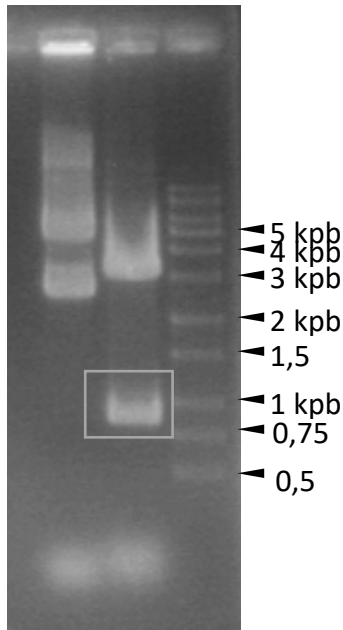


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa 0,8% visualizada con bromuro de etidio y luz UV. De izquierda a derecha: *pGEMT-PRNPov* sin digerir; *pGEMT-PRNPov* digerido con *HindIII* y *XhoI*. El recuadro muestra la banda correspondiente al inserto (863 pb comprobadas por secuenciación). La banda de 3 kpb corresponde al vector linealizado.

Expresión de la PrP^Crec

La proteína PrP^Crec se expresó cuando las cepas de *E. coli* portantes de la construcción *pRSET-B_PRNPov* fueron inducidas con 1 mM de IPTG. La proteína expresada fue identificada mediante WB usando tanto un anticuerpo monoclonal anti cola de histidina (Bio-Rad) como un anti PrP (clon 6h4, Prionics) (ver figura 24).

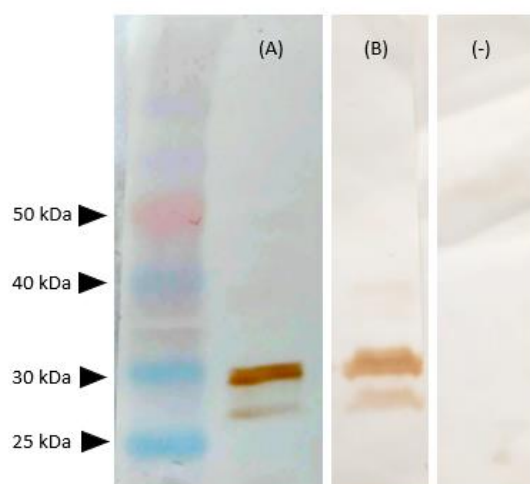


Figura 24. Detección por *Western Blot* de la PrP^Crec ovina utilizando anticuerpos anti cola de histidina (A) y anti-PrP (B). El control negativo es *E. coli* sin inducir utilizando anti cola de histidina. La banda de 30 kDa se corresponde con el tamaño esperado. Marcador de proteínas: *Blue Plus Protein Marker (Trans)*.

Purificación de PrP^Crec

De los cuatro métodos de purificación probados, el método de Vrentas et al. (2012) modificado fue el que posibilitó una mayor cantidad de PrP^Crec ovina en el eluido final. En cuanto al método híbrido, no pudo detectarse proteínas en el gel de acrilamida o por el método de Bradford (ver tabla 9).

Método de purificación	Concentración total de proteínas (mg/ml)	Porcentaje de PrP ^C rec ovina (%)	Concentración de PrP ^C rec ovina (mg/ml)
<i>Desnaturalizante</i>	0,6	6,4	0,038
<i>Vrentas et. al. (2012)</i>	1,7	9,6	0,16
<i>Vrentas modificado</i>	1,6	12	0,2

Tabla 9. Concentración de proteínas en base al promedio de 3 eluciones de PrP^Crec ovina purificada.

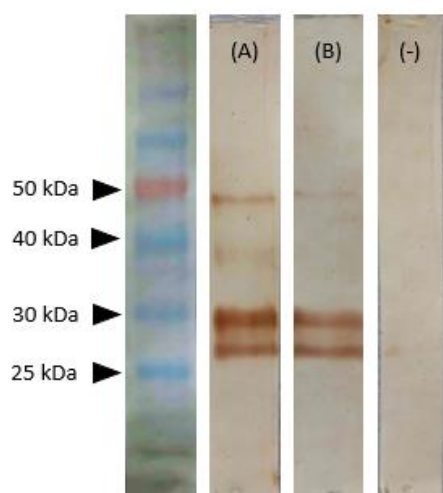


Figura 25. Detección mediante *Western Blot* de la PrP^Crec ovina utilizando anticuerpo anti PrP (clon 6h4, *Prionics*) y DAB como sustrato cromógeno. Marcador de proteínas: *Blue Plus Protein Marker (Trans)*

(a) PrP^Crec a partir de *E. coli* lisada.

(b) PrP^Crec purificada.

(-) *E. coli* sin inducir.

Evaluación de la sensibilidad a la PK

La PrP^Crec ovina purificada resultó ser sensible a la PK en todas las concentraciones probadas (50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 500 µg/ml). La única banda que se observa en la electroforesis de las digestiones corresponde al tamaño de la PK (30 kDa aproximadamente) que puede corroborarse con el control negativo (ver figura 26 y 27).

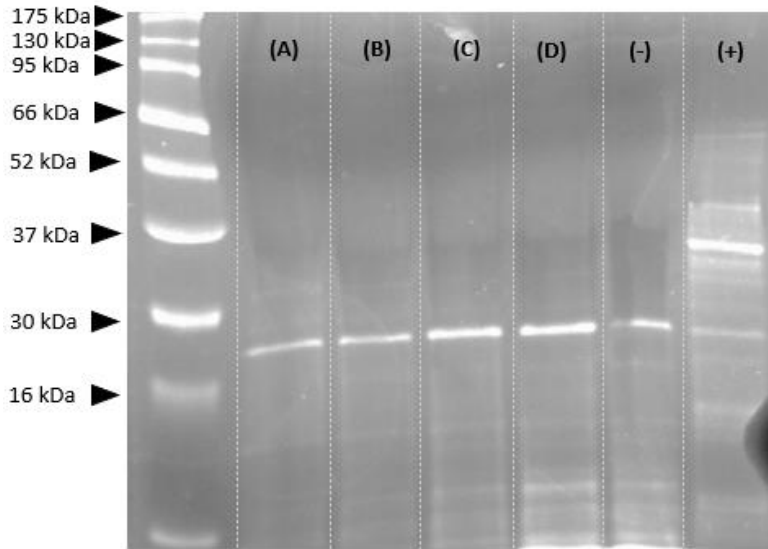


Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñidos con Coomassie de las digestiones de PrP^Crec.

(A) 50µg/ml de PK
(B) 100µg/ml de PK
(C) 200µg/ml de PK
(D) 500 µg/ml de PK
(-) Control, PK sin PrP^C
(+) Control, PrP^C sin digerir.

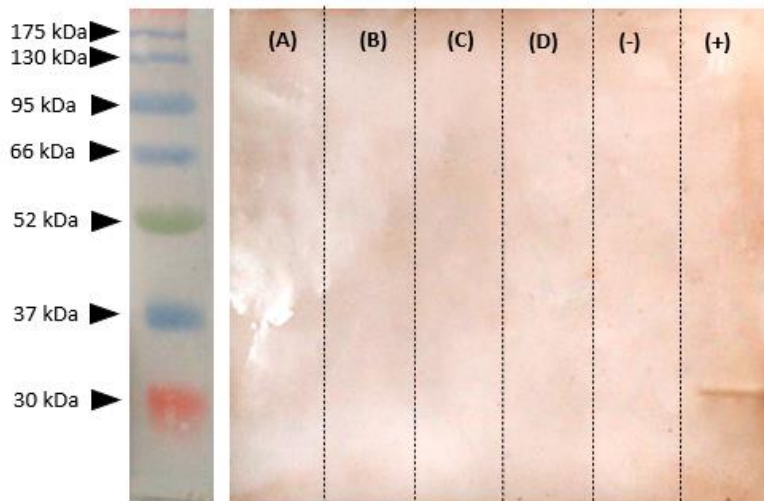


Figura 27. Western blot de las mismas digestiones de la figura 26. Solo se observa inmunoreactividad en el control positivo (+). Marcador de proteínas: *BLU*ltra *Prestained Protein Ladder* (Genbiotech).

Detección de anticuerpos anti-PrP en el suero de las gallinas inoculadas

Mediante dot blot, se observó que los anticuerpos presentes en el suero de las gallinas inmunizadas reconocieron la PrP^Crec ovina (ver figura 28). No se apreciaron diferencias evidentes entre las dos gallinas. Se observó una mayor señal con el suero extraído a los 49 días (T3). Con respecto al suero tomado previo a la inmunización, también mostró cierta reactividad, aunque en menor intensidad.

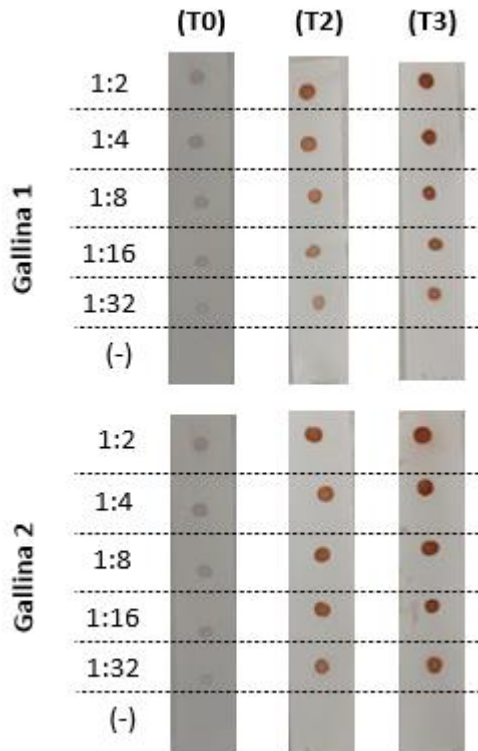


Figura 28. Detección por dot Blot de la inmunoreactividad de los anticuerpos del suero de las gallinas inoculadas. Del 1:2 a 1:32 corresponden a diluciones en PBS de PrP^Crec ovina. El control negativo (-) corresponde a PBS. Cada tira de nitrocelulosa fue incubada con una dilución 1:1000 del suero extraído de las gallinas los días 0 (T0), 28 (T2) y 49 (T3). Finalmente, las membranas fueron incubadas con anticuerpos anti-IgY conjugadas con peroxidasa (diluida 1:5000 en PBS-T) y reveladas con DAB.

Producción de IgY contra PrP^Crec ovina

Luego de la inmunización de gallinas ponedoras, siguiendo el esquema descrito, se realizó la purificación de anticuerpos IgY a partir de los huevos de las mismas. Se observó inmunoreactividad de los extractos tanto para la PrP^Crec ovina purificada como contra *E. coli* BL21. No hubo diferencias entre las reacciones correspondientes a PrP^Crec y *E. coli* BL21 (ver figura 29).

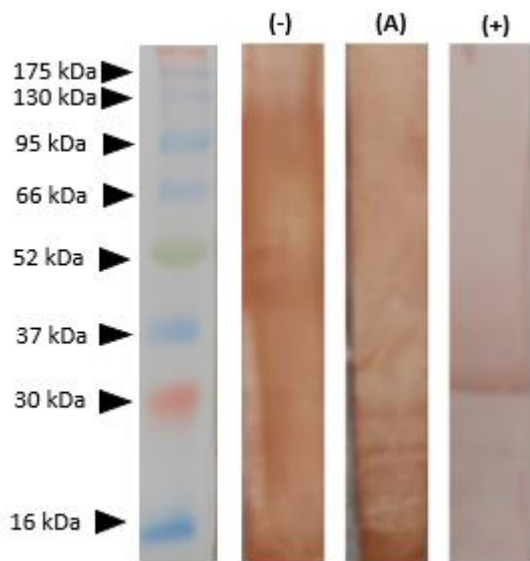


Figura 29. Detección por Western blot de la inmunoreactividad de los anticuerpos IgY de la gallina 2.
 (-) *E. coli* BL21.
 (A) PrP^Crec ovina purificada.
 El control positivo (+) corresponde a la PrP^Crec ovina purificada detectada con anticuerpo anti PrP (clon 6H4- Prionics). Marcador de proteínas: BLUtra Prestained Protein Ladder (Genbiotech).

Para reducir la presencia de anticuerpos que estuvieran detectando antígenos de la cepa de *E. coli* utilizada para la expresión de la proteína, se adsorbieron los extractos de IgY con *E. coli* BL21. Luego de la adsorción se lograron obtener bandas mucho más nítidas. La detección de la PrP^Crec ovina con el extracto de IgY fue muy similar al control positivo detectado con anticuerpos anti-PrP (clon 6H4, Prionics) (ver figura 30).

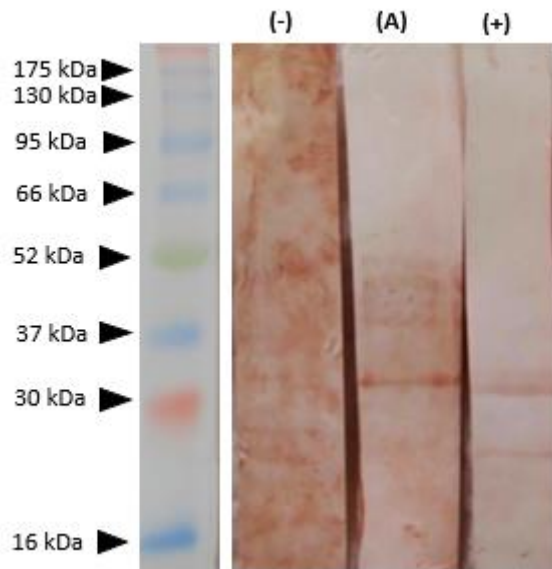


Figura 30. Detección por Western blot de la inmunoreactividad de los anticuerpos IgY de la gallina 2 luego de la adsorción con *E. coli* BL21.

(-) *E. coli* BL21.

(A) PrP^Crec ovina purificada.

El control positivo (+) corresponde a la PrP^Crec ovina purificada detectada con anticuerpo anti PrP (clon 6H4, Prionics). Marcador de proteínas: *BLUltra Prestained Protein Ladder* (Genbiotech).

Diagnóstico de scrapie mediante IHC

Todas las muestras de mucosa rectal y SNC (óbex) de los individuos testeados dieron negativas al diagnóstico de scrapie.

Detección de PrP^{Sc} a través de IHC utilizando IgY anti-PrP^C

Con el extracto de IgY adsorbido se detectó PrP^{Sc} en muestras de bovinos con encefalopatía espongiiforme bovina y ovinos con scrapie. Se utilizó IgY adsorbido con *E. coli* BL21 en una dilución 1:2 (ver figura 31) y 1:10 (ver figura 32) como anticuerpo primario e IgG anti-gallina conjugado con HRP (Thermofisher) como anticuerpo secundario, la reacción se reveló con DAB (Dako) como sustrato cromógeno. Los resultados se contrastaron con los obtenidos realizando el mismo procedimiento, pero utilizando un anticuerpo anti-PrP comercialmente disponible 99.97 (VMRD) y revelado con el sistema *EnVision* (Dako) (ver figura 31). Como control negativo del anticuerpo primario se utilizaron muestras de bovinos sin sintomatología nerviosa y como control negativo del anticuerpo secundario se siguió el mismo procedimiento sin aplicar anticuerpo primario (ver figura 33). Los anticuerpos IgY mostraron un patrón de inmunomarcación similar a la observada con el anticuerpo comercial anti-PrP (99.97, VMRD): se marcaron las mismas áreas en cortes del mismo tejido (ver figura 31). Sin embargo, los extractos de IgY también mostraron inmunoreactividad en los vasos

sanguíneos, específicamente en el endotelio (ver figura 31). Esta marcación indeseada fue mayor utilizando IgY adsorbida con *E. coli* BL21 en una dilución 1:2.

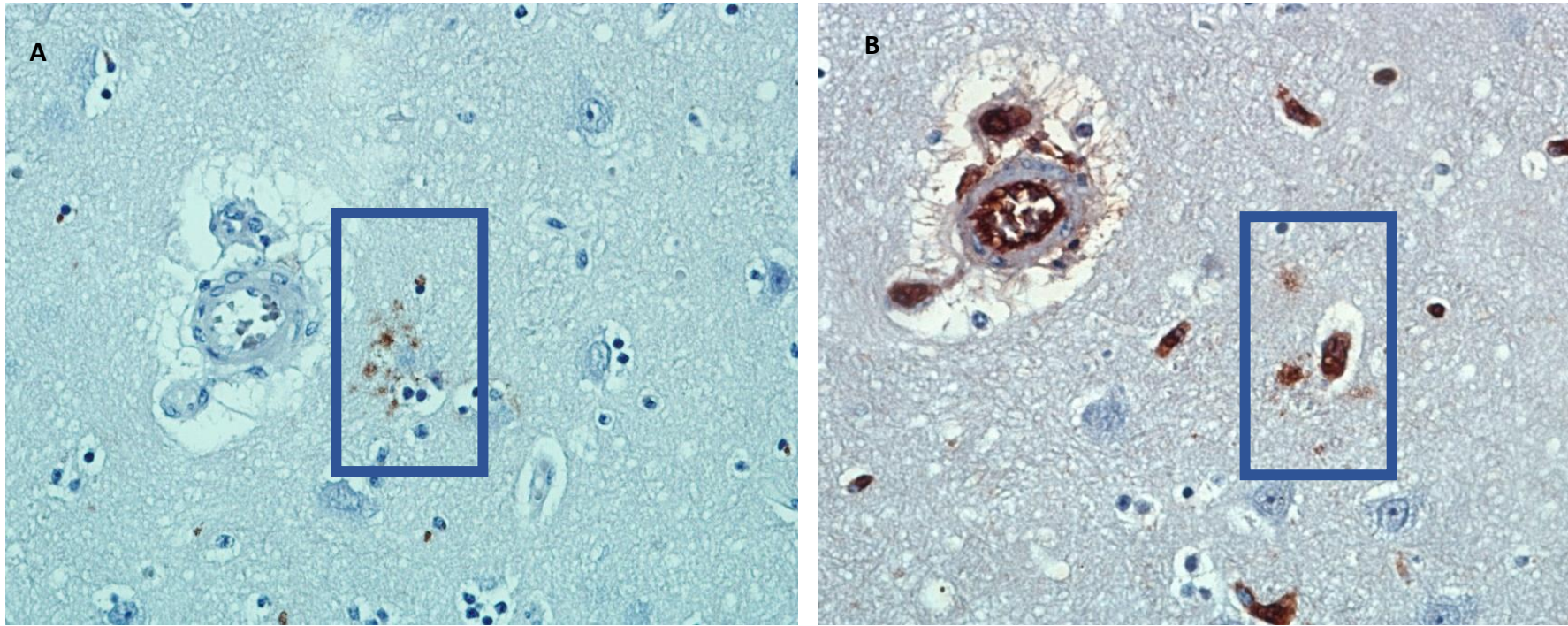


Figura 31. Detección inmunohistoquímica en tejido nervioso de un bovino con BSE (infectado con PrP^{EB}). En la imagen (A) se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PrP (clon 99.97, VMRD) y el sistema *Envision* (Dako). Dentro del recuadro azul se observa inmunoreactividad (granulado marrón-rojizo). En la imagen (B) se utilizó IgY (adsorbido con *E. coli* 1:2) como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-gallina conjugado con peroxidasa como anticuerpo secundario. Este corte es el subsiguiente al de la imagen (A), se observa inmunoreactividad en los vasos sanguíneos y en una región similar a la del control positivo (recuadro azul). Ambas se revelaron con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20.

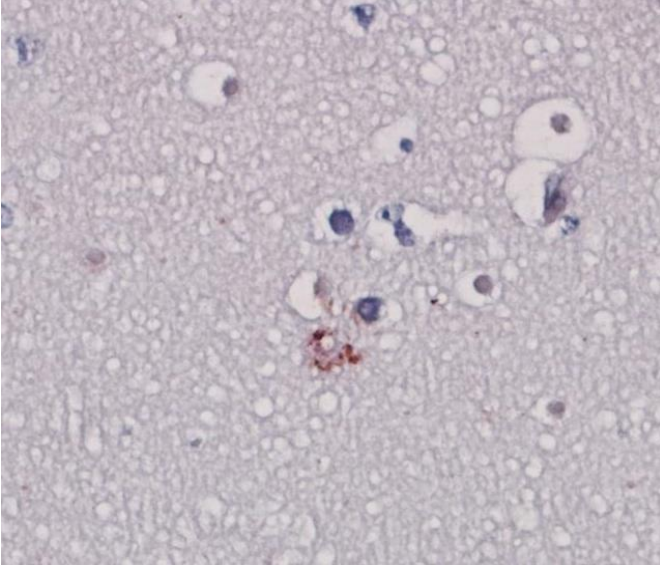


Figura 32. Detección inmunohistoquímica en tejido nervioso de un ovino infectado con scrapie utilizando IgY (adsorbido con *E. coli* 1:10) como anticuerpo primario. Se observa inmunoreactividad (granulado marrón-rojizo). Inmunohistoquímica con anti gallina conjugado con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20.

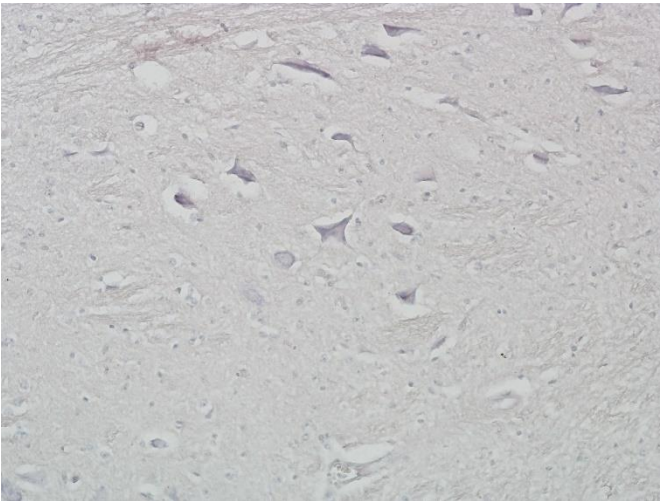


Figura 33. Control negativo del anticuerpo secundario. Detección inmunohistoquímica en tejido nervioso de un bovino. No se utilizó anticuerpo primario. No se observa inmunoreactividad (granulado marrón-rojizo). Inmunohistoquímica con IgG anti gallina conjugado con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20.

Detección de PrP^C a través de IHC utilizando IgY anti-PrP^C

Se logró inmunomarcación en tejido linfoide de ovinos (linfonódulos) fijados con SFZ utilizando los anticuerpos IgY anti-PrP^C obtenidos. Los resultados concuerdan con la marcación del control positivo utilizando un anticuerpo comercial anti-PrP (Prionics, clon 6H4) (ver figuras 34 y 35).

No se logró inmunomarcación en tejidos formolados con ninguno de los anticuerpos, bajo ninguna de las condiciones de recuperación antigénica probadas. Tanto los anticuerpos IgY desarrollados como el anti-PrP comercial (clon 6H4) dieron resultados negativos.

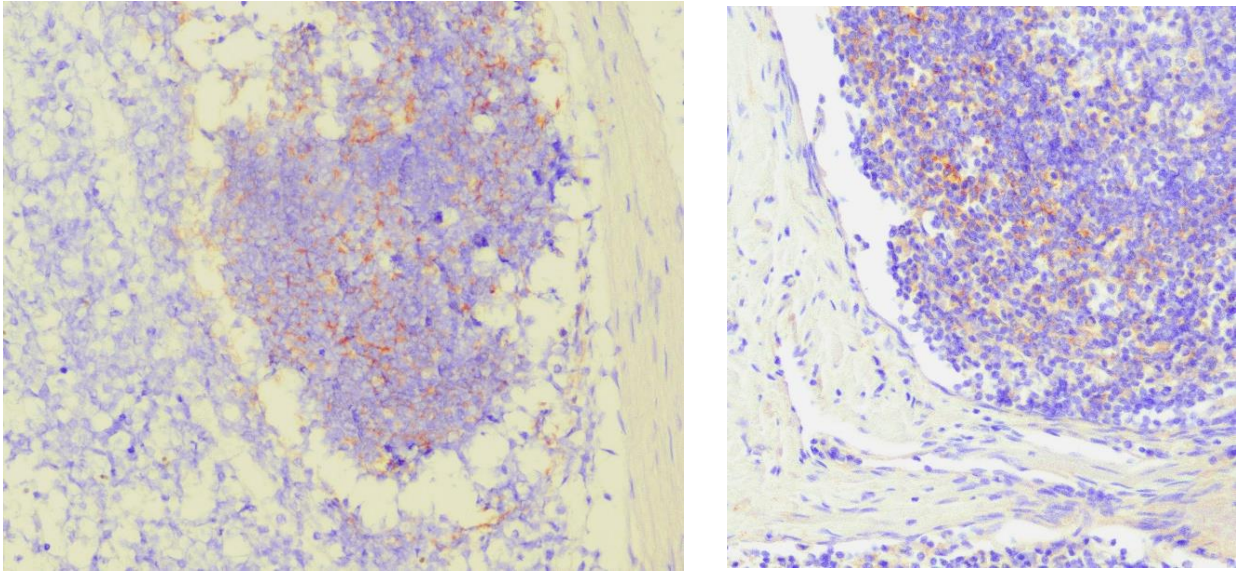


Figura 34. Detección inmunohistoquímica de PrP^C en LN de un ovino fijado en SFZ. Se utilizó anti-PrP (6H4) como anticuerpo primario. Se observa inmunoreactividad (granulado marrón-rojizo) en los folículos linfoides. Inmunohistoquímica con *EnVision* (Dako), revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20.

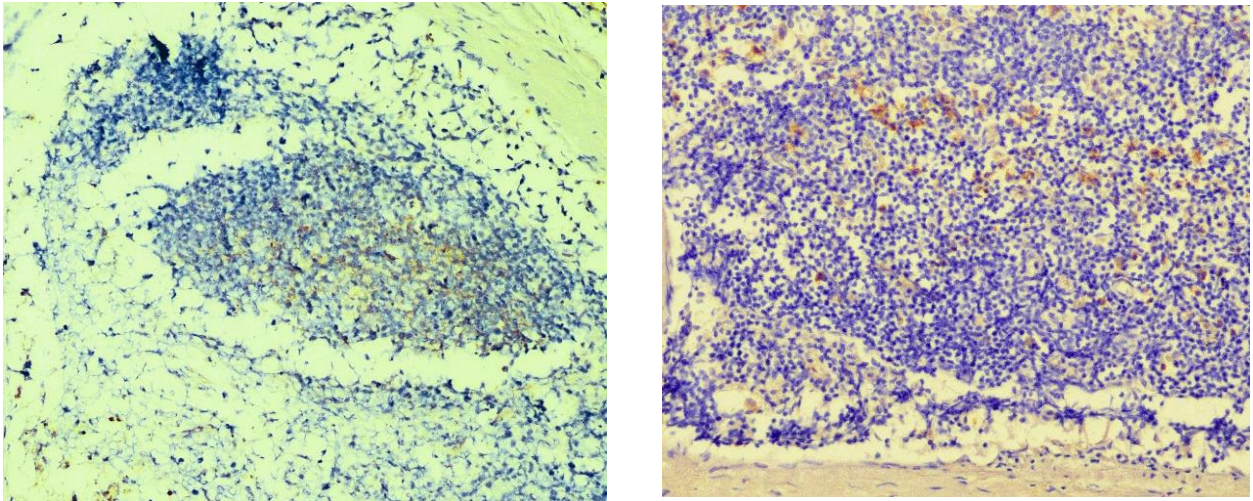


Figura 35. Detección inmunohistoquímica de PrP^C en LN de un ovino fijado en SFZ. Se utilizaron los anticuerpos IgY anti-PrP como anticuerpo primario. Se observa inmunoreactividad (granulado marrón-rojizo) en los folículos linfoides. Inmunohistoquímica con anti gallina conjugado con peroxidasa, revelado con DAB, contra-tinción con hematoxilina, X20.

Discusión

Producción de la PrP^Crec ovina

Se diseñaron primers específicos capaces de reconocer la región codificante del gen *PRNP* de los ovinos mediante PCR. Debido a la gran homología de la proteína priónica entre mamíferos (Rubenstein et al., 1999), el diseño de esta técnica permitió amplificar la región codificante también en bovinos. Otros autores describieron resultados similares. Roh et al., (2020) basándose en el gen *PRNP* del ovino, desarrollaron *primers* con capacidad de amplificar la secuencia en varias especies de cérvidos. En base a esto podríamos decir que la PCR diseñada permitiría realizar estudios de genotipos en ovinos, bovinos y probablemente en otras especies.

Siguiendo la metodología propuesta se obtuvo una proteína del tamaño esperado de 30 kDa (Prusiner, 1998), la cual contenía el agregado de histidina prevista para su purificación y detección mediante anticuerpos anti cola de histidina (Bio-Rad). La PrP^Crec ovina también fue detectada utilizando un anticuerpo anti-PrP tradicionalmente utilizado para el diagnóstico de EET (clon 6h4 de Prionics).

Para la purificación de la proteína recombinante producida se aplicó el método descrito por Vrentas (2012), el cual posibilitó una mayor concentración de PrP^Crec ovina en las eluciones. Sin embargo, para la utilización posterior del producto obtenido debieron introducirse algunas modificaciones para que pueda ser inoculado en las gallinas sin necesidad de ser dializada, reduciendo así la cantidad de pasos y el tiempo requerido. Esto resultó importante ya que, si bien la diálisis reduce la concentración de sustancias irritantes para los tejidos de los animales a inocular como 2-mercaptoetanol (White et al., 1973) y urea en altas concentraciones (Droegemueller et al., 1978), también disminuye la concentración final de la proteína de interés (Peter & Otto, 2010). Por lo dicho, se siguió el procedimiento mencionado, pero evitando el uso de estas sustancias en el buffer de elución. De esta manera se obtuvieron concentraciones de PrP^Crec similares al método original reduciendo el riesgo de lesiones en los animales inoculados.

Para la producción de la PrP^Crec se siguió la metodología propuesta por Hornemann et al. (1997) y Rezaei et al. (2000) que obtuvieron PrP^C recombinantes con las características estructurales típicas de la proteína priónica celular. Sin embargo, se decidió comprobar el riesgo biológico de esta proteína recombinante evaluando la sensibilidad a la PK de la misma, una vez purificada. La PrP^Crec resultó ser sensible a la PK lo que demostraría que no tiene capacidad infectiva ya que existe una relación directa entre la resistencia a la PK y la infectividad (Wang et al., 2018). En su trabajo, Wang et al. (2018) demuestra que la infectividad de los priones recombinante está codificada dentro de la estructura de los fragmentos de PrP resistentes a la PK. A su vez, para que los PrP^Crec posean esta resistencia a la PK, fueron convertidos previamente a PrP^{Sc} mediante PMCA (Wang et al., 2018). Al parecer para que ocurra la conversión de PrP^Crec a PrP^{Sc} son necesarias condiciones muy específicas de ciclos sucesivos de sonicación e incubación alternas en presencia de polianiones y/u otras sustancias como ocurre en la técnica de PMCA (Zhang et al., 2013). La proteína obtenida durante este

trabajo no fue expuesta a estas condiciones. Esto, sumado a su sensibilidad a la PK, sugieren la seguridad del producto obtenido.

Durante la evaluación del proceso de purificación se observó en el producto final la presencia de bandas que no correspondían al tamaño de la proteína de interés (aproximadamente 30 kDa) aunque varias de ellas fueron también reconocidas por el anticuerpo anti-PrP (clon 6H4 de *Prionics*). Por eso se evaluó la posibilidad de purificar la proteína directamente a través del corte y posterior elución por difusión de los geles de poliacrilamida a partir de las expresiones en *E. coli*. Sin embargo, este procedimiento se descartó ya que no fue posible diferenciar fácilmente un lisado inducido y otro no inducido en los geles (datos no presentados) debido a que la proteína generada no se expresa en una cantidad distinguible a simple vista. Por otro lado, el rendimiento de este método de purificación suele ser bajo, lo cual afectaría el procesamiento posterior de la proteína obtenida (Seelert & Krause, 2008).

Optimización de la detección de PrP^{Sc} y PrP^C a través de inmunohistoquímica utilizando el extracto de IgY anti- PrP^Crec

Los anticuerpos IgY producidos fueron capaces de detectar la PrP^{Sc} en tejido nervioso de animales con EEB y scrapie, obteniendo patrones de inmunomarcación similares a los observados con anticuerpos comerciales (99.97 VMRD y 6H4 Prionics). Esto indica que el producto generado no solo detecta PrP de origen ovino, sino que también presentan una reactividad cruzada con la PrP de origen bovino. Esta capacidad también la presentan varios de los anticuerpos comerciales utilizados en el diagnóstico de EET (Cordes et al., 2008; O'Rourke, Baszler, Miller, et al., 1998; Spraker et al., 2002) ya que la proteína priónica es muy conservada entre mamíferos (Rubenstein et al., 1999). Por este motivo, según el anticuerpo utilizado, puede usarse el mismo producto para diagnosticar scrapie, EEB o EDC.

Si bien la localización de la inmunomarcación obtenida fue similar a la observada con anticuerpos comerciales, la intensidad de la misma fue menor. Esto se relacionaría con el sistema de revelado utilizado con cada anticuerpo. Para el caso de los anticuerpos comerciales, se utilizó el sistema de detección empleado para el diagnóstico de EET, el sistema *EnVision* de *Dako*, el cual consiste en un complejo de polímeros marcados con HRP conjugado con anticuerpos secundarios anti-ratón y anti-conejo. La sensibilidad de este sistema es mayor que la descrita para los sistemas de streptavidina-biotina utilizados de rutina, y más aún que sistemas indirectos de un paso en los cuales la detección es realizada con un anticuerpo secundario conjugado con la enzima, como fue en este caso (anti-gallina conjugado con HRP de ThermoFisher) (Boenisch et al., 2002).

En la detección de anticuerpos anti-PrP^Crec en el suero de las gallinas inoculadas pudimos observar la presencia de anticuerpos reaccionantes al purificado de PrP^Crec previo a la inmunización probablemente debido a la presencia de proteínas de *E. coli* en los eluidos aun

luego de la purificación. Para eliminar estos anticuerpos anti *E. coli* y otros inespecíficos, se llevó a cabo un procedimiento de adsorción.

La adsorción de los anticuerpos IgY con *E. coli* en una dilución 1:2 redujo sensiblemente la marcación inespecífica en ensayos de Western blot, pero no fue suficiente para la IHQ ya que se observó una fuerte marcación no deseada de los vasos sanguíneos con esta técnica. A pesar de ser una proteína que se expresa en el endotelio (Turu et al., 2008), la PrP^C presente en los tejidos debería degradarse con el tratamiento con proteinasa K al que son sometidos durante el desarrollo de la técnica de IHQ para el diagnóstico de EET. A su vez, tal marcación no se observa utilizando anticuerpos comerciales. Por ello, entendemos que esta reacción de marcación no deseada corresponde a anticuerpos presentes en el extracto de anticuerpos IgY dirigidos contra una proteína no identificada del endotelio vascular o su lamina propia, y no a la presencia de PrP^C. Es por esto que se modificó el protocolo de adsorción aumentando la dilución a 1:10, con lo que se obtuvo una disminución considerable en la marcación de vasos sanguíneos. Por lo tanto, es posible que estos anticuerpos reconocieran proteínas con epítopes similares a PrP^Crec o a péptidos generados durante su producción no determinados durante este trabajo y estuvieran reaccionando de manera cruzada con algún antígeno de los vasos sanguíneos.

Respecto a la detección de la proteína priónica celular normal, los anticuerpos IgY producidos presentaron una inmunomarcación similar a la observada utilizando el anticuerpo 6H4 (Prionics) en tejido linfóide fijado con SFZ. Sin embargo, la PrP^C no pudo ser detectada a partir de tejidos fijados en formol al 10% con ninguno de los anticuerpos utilizados, a pesar de seguir procedimientos descritos previamente (Capellino, 2010; Davenport et al., 2017; Sørby et al., 2009). Estos trabajos describen la detección de PrP^C tanto en tejido linfóide como en sistema nervioso central utilizando diferentes protocolos, variando la solución fijadora, el anticuerpo primario y/o los sistemas de detección. En uno de los mismos se evaluaron muestras fijadas en formol al 10% y fijador de Bouin con diferentes anticuerpos (Capellino, 2010) y si bien el autor logró detectar PrP^C, no queda claro el procedimiento con el que obtuvo mejores resultados. En el presente trabajo se realizaron diferentes tratamientos de recuperación sin lograr la detección del antígeno ya sea con el anticuerpo desarrollado ni con el anticuerpo comercial 6H4. Se utilizó una olla a presión en lugar de autoclave ya que algunos autores recomiendan este remplazo en el diagnóstico inmunohistoquímico de EET debido a su practicidad (Andréoletti, 2004). Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros resultados y lo observado en el capítulo 2 para detección de otros antígenos, cambios menores podrían tener efecto en los resultados de la técnica. En este sentido, el uso de autoclave podría ser importante en la recuperación antigénica de PrP^C y tener efecto en el resultado de IHQ.

La ausencia de inmunomarcación de PrP^C en tejidos fijados en formol también podría estar influenciada por características propias del anticuerpo utilizado. El anticuerpo 6H4, si bien es capaz de detectar PrP^{Sc} en tejido fijado en formol, lo hace con una intensidad menor comparándolo con otros anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica (Cordes et al., 2008). En

los animales infectados se presentan acúmulos de PrP^{Sc} en los tejidos mientras que la expresión de la proteína priónica normal celular en tejido linfoide es baja en condiciones naturales (Austbø et al., 2006). Esto, sumado a la menor sensibilidad del anticuerpo monoclonal utilizado podría ser la causa de la ausencia de detección en tejido linfoide fijado en formol. Además, la mayoría de las investigaciones destinadas a evaluar la presencia de PrP^C mediante inmunohistoquímica suelen evitar el formaldehído como solución fijadora (Austbø et al., 2006; Miyazawa et al., 2007; Sørby et al., 2009; Thielen et al., 2001). En relación a esto último, es probable que en este trabajo no se haya probado el método de recuperación antigénica más apropiado para revelar el epítipo específico capaz de ser reconocido por el anticuerpo monoclonal utilizado. Sería recomendable utilizar en futuros estudios fijadores aptos para IHQ, como la SFZ evaluada en el presente trabajo. Sin embargo, debe considerarse el potencial riesgo de trabajar con muestras de tejidos en un fijador para el cual no se ha evaluado su actividad antimicrobiana.

Conclusiones

- Se diseñaron primers capaces de amplificar la región codificante del gen *PRNP* de ovinos y bovinos mediante PCR. Esto podrá ser de utilidad para el estudio de genotipos en estas y otras especies susceptibles a otras EET animales.
- Con la metodología empleada se logró obtener una PrP^C ovina recombinante y producirla en cantidad suficiente para su utilización posterior.
- Tal como fuera supuesto, la PrP^Crec obtenida fue inmunogénica para gallinas corroborando que la distancia filogenética entre especies sería una variable de importancia en el desarrollo de la respuesta inmune ante la exposición a PrP^C.
- Se logró la producción de anticuerpos IgY anti-PrP^Crec. Los mismos fueron capaces de reconocer PrP^{Sc} mediante IHQ en ovinos y bovinos infectados. Si bien deben ajustarse las condiciones de uso y validar el procedimiento, podría utilizarse para diagnóstico de EET animales en el futuro.
- No se logró detectar PrP^C en las muestras de tejido fijadas en formol con el anticuerpo desarrollado ni con el anticuerpo comercial 6H4. Esto podría deberse a las condiciones de trabajo empleadas.

Capítulo 4

Consideraciones finales

Las EET representan una barrera para el comercio de animales y sus productos entre países, siendo algunas de ellas un riesgo para la salud pública. El scrapie de ovinos y caprinos es la enfermedad del grupo con mayor cantidad de reportes anuales en el mundo, siendo a la vez la enfermedad modelo para el estudio de las EET en todas las especies.

El diagnóstico confirmatorio de las EET es postmortem, existiendo para el caso de scrapie la posibilidad de un diagnóstico antemortem preclínico. Su utilización tendría importancia al momento de ingresar animales a países o áreas libres de la enfermedad. Para ello se realiza la detección de PrP^{Sc} en biopsias tejido linfoide asociado a las mucosas del tercer párpado o rectal, recomendándose evaluar al menos 6 folículos linfoides en cada muestra. Considerando la relevancia del diagnóstico preclínico, en este trabajo se propuso estudiar el tejido linfoide asociado a estas mucosas en ovinos y caprinos bajo la hipótesis de que existen cambios en su composición de acuerdo a su edad.

Los resultados obtenidos rechazan la hipótesis planteada, ya que no se observaron diferencias en la cantidad o composición celular del tejido linfoide de las mucosas palpebral y rectal de los ovinos analizados de acuerdo a su edad. Esto podría deberse a que, a diferencia de lo reportado en otras regiones del mundo, efectivamente no existieran tales diferencias en el tejido linfoide de mucosas entre animales jóvenes y adultos de nuestro país, o a que las mismas no fueran evidenciadas con el criterio de edad utilizado en este trabajo. Si bien no fue evaluado particularmente en este estudio, el sistema productivo empleado tendría influencia en el desarrollo del tejido linfoide de mucosas. Esto ha sido propuesto por otros autores, y podría sugerirse con los resultados observados ya que caprinos mantenidos en confinamiento parcial tuvieron mayor desarrollo de tejido linfoide palpebral que los ovinos criados en condiciones extensivas (cuenca del Salado de la provincia de Buenos Aires).

Para el diagnóstico preclínico de scrapie resulta clave la presencia de tejido linfoide en las mucosas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que su aparición sería esporádica en el tercer párpado, y que en el recto el mismo se concentraría en la porción terminal, adyacente a la unión mucocutánea. Por esto sería recomendable utilizar esta última como muestra para diagnóstico, indicando al momento de su realización la cantidad de folículos incluidos en la misma.

La caracterización celular del tejido linfoide resultó compleja. A pesar de las dificultades encontradas a trabajar con muestras fijadas en formol, se identificaron los marcadores de interés. Así, se observó una mayor detección de CD21 en la mucosa rectal respecto de la palpebral. Considerando que las células dendríticas foliculares (CD21+) son importantes en la acumulación PrP^{Sc} en el tejido linfoide, esta muestra tendría mayor utilidad para diagnóstico preclínico de scrapie. De manera similar a lo mencionado para la presencia de tejido linfoide, no se observó diferencia en la expresión de CD21 en tejidos de animales jóvenes y adultos, pudiendo deberse al criterio de clasificación por edad empleado y al número de muestras analizadas. Tampoco se observaron diferencias entre mucosas o edades para los marcadores

CD3 o L1. Los patrones de marcación observados sugieren que las poblaciones de linfocitos T y macrófagos se distribuyen en los animales analizados de manera similar a lo propuesto en la bibliografía.

Durante la realización del presente trabajo se obtuvo una proteína PrP^C recombinante, y un anticuerpo IgY capaz de reconocer PrP^C en tejidos de ovinos sanos. Sin embargo, no se logró detectar PrP^C en tejido linfoide de las muestras analizadas asociando tal resultado al proceso de fijación con formol al 10% realizado, a pesar de evaluar diferentes condiciones de recuperación antigénica. Esto podría relacionarse con la sensibilidad del antígeno al formol, como a la naturaleza de los anticuerpos utilizados ya sean comerciales o al desarrollado.

La IgY obtenida permitió reconocer al agente causal de scrapie y de la encefalopatía espongiiforme bovina mediante IHQ en tejidos de animales infectados provistos por laboratorios de referencia para estas enfermedades (OMSA). Así, el producto generado podrá utilizarse en futuros estudios relacionados con las EET animales, como así también en el diagnóstico de rutina (vigilancia epidemiológica) una vez validado el procedimiento.

Como resultado de este trabajo se generó información, procedimientos de laboratorio y un anticuerpo capaz de detectar al agente responsable de una enfermedad compleja. Su aplicación colaborará en la prevención del ingreso de scrapie, será de utilidad para las actividades de vigilancia y control que se realizan actualmente en Argentina, y servirá de inicio para futuros estudios vinculados a las EET animales.

La presente tesis se logró desarrollando ideas y procedimientos a partir de la experiencia adquirida en laboratorios de instituciones de estatales. Estas han mostrado ser fundamentales para encontrar soluciones a problemas tanto globales como locales. Su fortalecimiento y estímulo será fundamental en el desarrollo económico y social de nuestro país y la región.

Referencias

- Abrial, D., Calavas, D., Jarrige, N., & Ducrot, C. (2004). Poultry, pig and the risk of BSE following the feed ban in France--a spatial analysis. *Veterinary Research*, 36(4), 615–628. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005020>
- Aleksandersen, M., Nicander, L., & Landsverk, T. (1991). Ontogeny, distribution and structure of aggregated lymphoid follicles in the large intestine of sheep. *Developmental and Comparative Immunology*, 15(4), 413–422. [https://doi.org/10.1016/0145-305X\(91\)90033-U](https://doi.org/10.1016/0145-305X(91)90033-U)
- Allen, C. D. C., & Cyster, J. G. (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Seminars in Immunology*, 20(1), 14. <https://doi.org/10.1016/J.SMIM.2007.12.001>
- Allepuz, A., López-Quílez, A., Forte, A., Fernández, G., & Casal, J. (2007). Spatial analysis of bovine spongiform encephalopathy in Galicia, Spain (2000–2005). *Preventive Veterinary Medicine*, 79(2–4), 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.11.012>
- 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., Austin, A. R., & Wells, G. A. H. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382(6594), 779–788. <https://doi.org/10.1038/382779a0>
- Andréoletti, O. (2004). PrPSc Immunohistochemistry. *Techniques in Prion Research*, 82–96. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7949-1_7
- Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M., & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *Journal of General Virology*, 81(12), 3115–3126. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3115>
- Andréoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eycheenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M., & Schelcher, F. (2002). PrPSc accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: Influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *Journal of General Virology*, 83(10), 2607–2616. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2607>
- Andréoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaïse, C., Simon, S., Le Dur, A., Laude, H., Simmons, H., Lugan, S., Corbière, F., Costes, P., Morel, N., Schelcher, F., & Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathogens*, 7(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001285>

- Animal and Plant Health Inspection Service. (2022). *National Scrapie Surveillance Plan*. <https://unsplash.com/s/photos/sheep>
- Animal and Plant Health Inspection Service. (2023). *National Scrapie Eradication Program*. <https://www.aphis.usda.gov/aphis/ourfocus/animalhealth/animal-disease-information/sheep-and-goat-health/national-scrapie-eradication-program/nsep>
- APHA. (2019). *Animal and Plant Health Agency*. Neuropathology: Confirmatory Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) in Cattle and Small Ruminants. [https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/Confirmatory%20\(Histo%20&%20IHC\)%20diagnostic%20criteria_Rev_Jan2019.pdf](https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/Confirmatory%20(Histo%20&%20IHC)%20diagnostic%20criteria_Rev_Jan2019.pdf)
- Aşti, R. N., Kurtdede, N., Altunay, H., & Özen, A. (2000). Electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in Angora goats. *DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 107(5), 196–198. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10887672/>
- Austbø, L., Espenes, A., Olsaker, I., McL. Press, C., & Skretting, G. (2006). Lymphoid follicles of the ileal Peyers's patch of lambs express low levels of PrP, as demonstrated by quantitative real-time RT-PCR on microdissected tissue compartments, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Journal of General Virology*, 87(11), 3463–3471. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.82008-0/CITE/REFWORKS>
- Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., & Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerging Infectious Diseases*, 24(6), 1029–1036. <https://doi.org/10.3201/eid2406.172007>
- Baker, H. F., Ridley, R. M., & Wells, G. A. H. (1993). Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Veterinary Record*, 132(16), 403 LP – 406. <https://doi.org/10.1136/vr.132.16.403>
- Balkema-Buschmann, A., Ziegler, U., McIntyre, L., Keller, M., Hoffmann, C., Rogers, R., Hills, B., & Groschup, M. H. (2011). Experimental Challenge of Cattle with German Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Isolates. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 74(2–4), 103–109. <https://doi.org/10.1080/15287394.2011.529060>
- Baron, T. G. M., Madec, J.-Y., & Calavas, D. (1999). Similar Signature of the Prion Protein in Natural Sheep Scrapie and Bovine Spongiform Encephalopathy-Linked Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(11), 3701–3704. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.11.3701-3704.1999>
- Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E., Goldmann, W., Smith, A., Sivam, K., Tongue, S., & Gravenor, M. B. (2004). Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *Journal of General Virology*, 85(9), 2735–2740. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79876-0>

- Beckstead, J. H. (1994). A simple technique for preservation of fixation-sensitive antigens in paraffin-embedded tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 42(8), 1127–1134. <https://doi.org/10.1177/42.8.8027531>
- Bellworthy, S. J., Hawkins, S. A. C., Green, R. B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., Lockey, R., Ryder, S., Berthelin-Baker, C., Simmons, M. M., & Jeffrey, M. (2005). Tissue distribution of bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Veterinary Record*, 156(7), 197–202. <https://doi.org/10.1136/vr.156.7.197>
- Benavides, J., García-Pariente, C., Gelmetti, D., Fuertes, M., Ferreras, M. C., García-Marín, J. F., & Pérez, V. (2006). Effects of fixative type and fixation time on the detection of Maedi Visna virus by PCR and immunohistochemistry in paraffin-embedded ovine lung samples. *Journal of Virological Methods*, 137(2), 317–324. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2006.07.009>
- Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W., & Nöremark, M. (2008). Atypical/Nor98 scrapie: Properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Veterinary Research*, 39(4), 1–14. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007056>
- Benestad, S. L., Mitchell, G., Simmons, M. M., Ytrehus, B., & Vikøren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Veterinary Research*, 47(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0375-4>
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M. A., & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record*, 153(7), 202–208. <https://doi.org/10.1136/vr.153.7.202>
- Bertolo, P. H. L., Moutinho da Conceição, M. E. B. A., Emboaba da Costa, R. R. M., Jacintho, A. P. P., Cipriano, R. S., Moreira, P. R. R., Ferreira, M. A., Machado, G. F., & de Oliveira Vasconcelos, R. (2022). Influence of serum progesterone levels on the inflammatory response of female dogs with visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 302, 109658. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2022.109658>
- Besarab, A., DeLucia, T., Picarello, N., & Jungkind, D. (1993). Formaldehyde, sodium hypochlorite, and metabisulphite are equally effective as sterilants for central delivery systems. *ASAIO Journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, 39(3). <https://doi.org/10.1097/00002480-199307000-00090>
- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., & Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Reports*, 5(1), 110–115. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400054>

- Birkett, C. R., Foster, J. D., Hunter, N., Dornan, J., Farquhar, C. F., Jeffrey, M., Hennion, R. M., Goldmann, W., Grover, D., Somerville, R. A., & Percy, C. (1997). Immunodetection of PrPSc in spleens of some scrapie-infected sheep but not BSE-infected cows. *Journal of General Virology*, 78(9), 2389–2396. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2389>
- Blanco Viera, F., Carrillo, B., Weber, E., Bardon JC, Combessies, G., Cordeviola JM, Nosedá, R., Soni, C., & Schudel, A. (1998). Casuística neuropatológica. Estudio microscópico de los casos clínicos remitidos al programa de vigilancia de BSE en Argentina, durante el período comprendido entre 1994–1996. *Rev Med Vet*, 79, 226–230.
- Boenisch, T., Farmilo, A. J., & Stead, R. (2002). *Handbook of immunochemical staining methods*. (Sixth). Dako Cytomation Corp.
- Bons, N., Mestre-Frances, N., Belli, P., Cathala, F., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (1999). Natural and experimental oral infection of nonhuman primates by bovine spongiform encephalopathy agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 4046–4051. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4046>
- Bons, N., Mestre-Francés, N., Charnay, Y., & Tagliavini, F. (1996). Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. In *Lancet (London, England)* (Vol. 348, Issue 9019, p. 55). [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)24027-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)24027-9)
- Bradley, R. (1991). Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the current situation and research. *European Journal of Epidemiology*, 7(5), 532–544. <https://doi.org/10.1007/bf00143136>
- Brandtzaeg, P., Jones, D. B., Flavell, D. J., & Fagerholi, M. K. (1988). Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. *Journal of Clinical Pathology*, 41(9), 963. <https://doi.org/10.1136/JCP.41.9.963>
- Brandtzaeg, P., & Pabst, R. (2004). Let's go mucosal: Communication on slippery ground. *Trends in Immunology*, 25(11), 570–577. <https://doi.org/10.1016/j.it.2004.09.005>
- Breugelmans, S., Van den Broeck, W., Demeyere, K., Meyer, E., & Simoens, P. (2011). Immunoassay of lymphocyte subsets in ovine palatine tonsils. *Acta Histochemica*, 113(4), 416–422. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2010.03.001>
- Brown, K. F. D., Stewart, K., Ritchie, D. L., Mabbott, N. A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W. I., & Bruce, M. E. (1999). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nature Medicine*, 5(11), 1308–1312. <https://doi.org/10.1038/15264>
- Brown, P., McShane, L., Zanusso, G., & Detwiler, L. (2006). On the Question of Sporadic or Atypical Bovine Spongiform Encephalopathy and Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1816–1821. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060965>

- Bruce, M. E., Brown, K. F. D., Mabbott, N. A., Farquhar, C. F., & Jeffrey, M. (2000). Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunology Today*, 21(9), 442–446. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01696-0](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01696-0)
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that “new variant” CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389(6650), 498–501. <https://doi.org/10.1038/39057>
- Buschmann, A., Gretzschel, A., Biacabe, A.-G., Schiebel, K., Corona, C., Hoffmann, C., Eiden, M., Baron, T., Casalone, C., & Groschup, M. H. (2006). Atypical BSE in Germany—Proof of transmissibility and biochemical characterization. *Veterinary Microbiology*, 117(2–4), 103–116. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.06.016>
- Buschmann, A., Lühken, G., Schultz, J., Erhardt, G., & Groschup, M. H. (2004). Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *Journal of General Virology*, 85(9), 2727–2733. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79997-0>
- Canadian Food Inspection Agency. (2022). *Fact sheet - Scrapie*. <https://inspection.canada.ca/animal-health/terrestrial-animals/diseases/reportable/scrapie/fact-sheet/eng/1356131973857/1356132310673>
- Canadian Food Inspection Agency. (2023a). *Chapter 7 - Scrapie Flock Certification Program*. <https://inspection.canada.ca/animal-health/terrestrial-animals/diseases/accredited-veterinarian-s-manual/chapter-7/eng/1345472078870/1345472451638?chap=0#c2>
- Canadian Food Inspection Agency. (2023b). *Flocks infected with scrapie in Canada*. <https://inspection.canada.ca/animal-health/terrestrial-animals/diseases/reportable/scrapie/herds-infected/eng/1562600483485/1562600483734>
- Capellino, F. (2010). *Expresión y distribución de la proteína priónica celular en tejidos de ovinos y ciervos*. Universidad de Buenos Aires.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., & Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3065–3070. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305777101>
- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., & Andreóletti, O.

- (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6821>
- Cesta, M. F. (2006). Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicologic Pathology*, 34(5), 599–608. <https://doi.org/10.1080/01926230600865531>
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in Mice Produced By Inoculation With Scrapie Brain Material. *The Lancet*, 277(7191), 1378–1379. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(61\)92008-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(61)92008-6)
- Chandler, R. L., & Fisher, J. (1963). Experimental Transmission of Scrapie To Rats. *The Lancet*, 282(7318), 1165. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(63\)90820-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(63)90820-1)
- Chiocchetti, R., Mazzuoli, G., Albanese, V., Mazzoni, M., Clavanzani, P., Lalatta-Costerbosa, G., Lucchi, M. L., Di Guardo, G., Marruchella, G., & Furness, J. B. (2008). Anatomical evidence for ileal Peyer's patches innervation by enteric nervous system: a potential route for prion neuroinvasion? *Cell and Tissue Research*, 332(2), 185–194. <https://doi.org/10.1007/S00441-008-0583-Y>
- Chodosh, J., Nordquist, R. E., & Kennedy, R. C. (1998). Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Developmental and Comparative Immunology*, 22(5–6), 621–630. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(98\)00022-6](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(98)00022-6)
- Comoy, E., Mikol, J., Luccantoni-Freire, S., Correia, E., Lescoutra-Etcheagaray, N., Durand, V., Dehen, C., Andreoletti, O., Casalone, C., Richt, J. A., Greenlee, J. J., Baron, T., Benestad, S. L., Brown, P., & Deslys, J. P. (2015). Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period. *Scientific Reports*, 5, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep11573>
- Comoy, E., Mikol, J., Ruchoux, M.-M., Durand, V., Luccantoni-Freire, S., Dehen, C., Correia, E., Casalone, C., Richt, J., Greenlee, J., Torres, J., Brown, P., & Deslys, J.-P. (2013). Evaluation of the Zoonotic Potential of Transmissible Mink Encephalopathy. *Pathogens*, 2(3), 520–532. <https://doi.org/10.3390/pathogens2030520>
- Cook, R. W., Bingham, J., Besier, A. S., Bayley, C. L., Hawes, M., Shearer, P. L., Yamada, M., Bergfeld, J., Williams, D. T., & Middleton, D. J. (2016). Atypical scrapie in Australia. *Australian Veterinary Journal*, 94(12), 452–455. <https://doi.org/10.1111/avj.12529>
- Cordes, H., Bergström, A. L., Ohm, J., Laursen, H., & Heegaard, P. M. H. (2008). Characterisation of new monoclonal antibodies reacting with prions from both human and animal brain tissues. *Journal of Immunological Methods*, 337(2), 106–120. <https://doi.org/10.1016/J.JIM.2008.07.004>

- Curnow, R. N., & Hau, C. M. (1996). The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. *Veterinary Record*, *138*(17), 407–408. <https://doi.org/10.1136/vr.138.17.407>
- Cyster, J. G., Ansel, K. M., Reif, K., Ekland, E. H., Hyman, P. L., Tang, H. L., Luther, S. A., & Ngo, V. N. (2000). Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunological Reviews*, *176*(1), 181–193. <https://doi.org/10.1034/J.1600-065X.2000.00618.X>
- Dagleish, M. P., Finlayson, J., Steele, P. J., Pang, Y., Hamilton, S., Eaton, S. L., Sales, J., González, L., & Chianini, F. (2012). Immunophenotype of Cells within Cervine Rectoanal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue and Mesenteric Lymph Nodes. *Journal of Comparative Pathology*, *146*(4), 365–371. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2011.08.007>
- Davenport, K. A., Hoover, C. E., Bian, J., Telling, G. C., Mathiason, C. K., & Hoover, E. A. (2017). PrPC expression and prion seeding activity in the alimentary tract and lymphoid tissue of deer. *PLoS One*, *12*(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0183927>
- de Andrade, C. P., de Oliveira, E. C., Leal, J. S., de Almeida, L. L., de Castro, L. A., da Silva, S. C., & Driemeier, D. (2015). Report of outbreaks of classical scrapie in Dorper sheep and associated prion protein gene polymorphisms in affected flocks. *Tropical Animal Health and Production*, *47*(6), 1203–1212. <https://doi.org/10.1007/S11250-015-0849-9>
- De Bosschere, H., Roels, S., Dechamps, P., & Vanopdenbosch, E. (2007). TSE detected in a Belgian ARR-homozygous sheep via active surveillance. *Veterinary Journal*, *173*(2), 449–451. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.07.014>
- DEFRA. (2019). *TSE surveillance statistics: exotic species and domestic cats*. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/840096/pub-tse-stats-exotic.pdf
- Dickinson, A. G., Meikle, V. M. H., & Fraser, H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *Journal of Comparative Pathology*, *78*(3), 293–299. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(68\)90005-4](https://doi.org/10.1016/0021-9975(68)90005-4)
- do Prado Duzanski, A., Flórez, L. M. M., Fêo, H. B., Romagnoli, G. G., Kaneno, R., & Rocha, N. S. (2022). Cell-mediated immunity and expression of MHC class I and class II molecules in dogs naturally infected by canine transmissible venereal tumor: Is there complete spontaneous regression outside the experimental CTVT? *Research in Veterinary Science*, *145*, 193–204. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2022.02.020>
- Domingo, J. L. (2002). Lack of experimental studies on human transmission of BSE in relation with the consumption of specified risk materials (SRM): The case of the milk. *Preventive Medicine*, *34*(6), 655–656. <https://doi.org/10.1006/pmed.2002.1027>

- Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Ghani, A. C., Wilesmith, J. W., & Anderson, R. M. (1997). Analysis of dam-calf pairs of BSE cases: Confirmation of a maternal risk enhancement. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 264(1388), 1647–1656. <https://doi.org/10.1098/rspb.1997.0229>
- Droegemueller, W., Chvapil, M., Vining, J., Whitaker, L., & Christian, C. D. (1978). Urea and dilatation of the cervix. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 132(7), 775–782. [https://doi.org/10.1016/S0002-9378\(78\)80012-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9378(78)80012-X)
- Edwards, J. C., Moore, S. J., Hawthorn, J. A., Neale, M. H., & Terry, L. A. (2010). PrPSc is associated with B cells in the blood of scrapie-infected sheep. *Virology*, 405(1), 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.023>
- Edwards, J. H., Jones, G. L., Herbert, A., Fisher, J., & Ingham, E. (2021). Integration and functional performance of a decellularised porcine superflexor tendon graft in an ovine model of anterior cruciate ligament reconstruction. *Biomaterials*, 279, 121204. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2021.121204>
- EFSA. (2021). The European Union summary report on surveillance for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in 2020. *EFSA Journal*, 19(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6934>
- Eiden, M., Hoffmann, C., Balkema-Buschmann, A., Muller, M., Baumgartner, K., & Groschup, M. H. (2010). Biochemical and immunohistochemical characterization of feline spongiform encephalopathy in a German captive cheetah. *Journal of General Virology*, 91(11), 2874–2883. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022103-0>
- Eloit, M., Adjou, K., Couplier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Androletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Gaelle Biacabe, A., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., ... Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Veterinary Record*, 156(16), 523–524. <https://doi.org/10.1136/vr.156.16.523-b>
- Epstein, V., Pointing, S., & Halfacre, S. (2005). Atypical scrapie in the Falkland Islands. *Veterinary Record*, 157(21), 667–668. <https://doi.org/10.1136/vr.157.21.667-c>
- Eraña, H., Charco, J. M., González-Miranda, E., García-Martínez, S., López-Moreno, R., Pérez-Castro, M. A., Díaz-Domínguez, C. M., García-Salvador, A., & Castilla, J. (2020). Detection of pathognomonic biomarker PrPsc and the contribution of cell free-amplification techniques to the diagnosis of prion diseases. *Biomolecules*, 10(3), 1–44. <https://doi.org/10.3390/biom10030469>
- Espenes, A., Press, C. McL., Landsverk, T., Tranulis, M. A., Aleksandersen, M., Gunnes, G., Benestad, S. L., Fuglestveit, R., & Ulvund, M. J. (2006). Detection of PrPSc in Rectal Biopsy

- and Necropsy Samples from Sheep with Experimental Scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 134(2–3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.08.001>
- Espinosa, J. C., Morales, M., Castilla, J., Rogers, M., & Torres, J. M. (2007). Progression of prion infectivity in asymptomatic cattle after oral bovine spongiform encephalopathy challenge. *Journal of General Virology*, 88(4), 1379–1383. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82647-0>
- EU TSE Reference Laboratory. (2013). *Clinical signs of transmissible spongiform encephalopathies in sheep*. <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/clinical-signs-tse-sheep-stills.pdf>
- Evans, H. E. (Howard E., & Miller, M. E. (Malcolm E. (2016). Miller's Anatomy of the Dog, 4th edition. *The Canadian Veterinary Journal*, 57(4), 381. [/pmc/articles/PMC4790228/](https://doi.org/10.1139/cvja-2016-0001)
- Everest, S. J., Thorne, L. T., Hawthorn, J. A., Jenkins, R., Hammersley, C., Ramsay, A. M., Hawkins, S. A., Venables, L., Flynn, L., Sayers, R., Kilpatrick, J., Sach, A., Hope, J., & Jackman, R. (2006). No abnormal prion protein detected in the milk of cattle infected with the bovine spongiform encephalopathy agent. *Journal of General Virology*, 87(8), 2433–2441. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81491-0>
- Fediaevsky, A., Tongue, S. C., Nöremark, M., Calavas, D., Ru, G., & Hopp, P. (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Veterinary Research*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-19>
- Flavell, D. J., Jones, D. B., & Wright, D. H. (1987). Identification of tissue histiocytes on paraffin sections by a new monoclonal antibody. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 35(11), 1217–1226. <https://doi.org/10.1177/35.11.3309045>
- Foster, J. D., Goldmann, W., & Hunter, N. (2013). Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079433>
- Foster, J. D., Hope, J., & Fraser, H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Veterinary Record*, 133(14), 339–341. <https://doi.org/10.1136/vr.133.14.339>
- Fox, K. A., Jewell, J. E., Williams, E. S., & Miller, M. W. (2006). Patterns of PrPCWD accumulation during the course of chronic wasting disease infection in orally inoculated mule deer (*Odocoileus hemionus*). *Journal of General Virology*, 87(11), 3451–3461. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81999-0>
- Fraser, H., McConnell, I., Wells, G. A. H., & Dawson, M. (1988). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to mice. *Veterinary Record*, 123(18), 472–472. <https://doi.org/10.1136/vr.123.18.472>

- Frost, A. R., Sparks, D., & Grizzle, W. E. (2000). Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology: AIMM*, 8(3), 236–243. <https://doi.org/10.1097/00129039-200009000-00011>
- Gabriel, J. M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M., & Prusiner, S. B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9097–9101. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.19.9097>
- Garza, M. C., Eraña, H., Castilla, J., Acín, C., Vargas, A., Badiola, J. J., & Monleón, E. (2017). Protein misfolding cyclic amplification corroborates the absence of PrP Sc accumulation in placenta from fetuses with the ARR/ARQ genotype in natural scrapie. *Veterinary Microbiology*, 203(October 2016), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.034>
- Gavier-Widén, D., Stack, M. J., Baron, T., Balachandran, A., & Simmons, M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: A review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 509–527. <https://doi.org/10.1177/104063870501700601>
- Gibbs, C. J., Amyx, H. L., Bacote, A., Masters, C. L., & Gajdnsek, D. C. (1980). Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease, and scrapie to nonhuman primates. *Journal of Infectious Diseases*, 142(2), 205–208. <https://doi.org/10.1093/infdis/142.2.205>
- Giuliano, E. A., & Finn, K. (2011). Characterization of membranous (M) cells in normal feline conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT). *Veterinary Ophthalmology*, 14 Suppl 1(SUPPL. 1), 60–66. <https://doi.org/10.1111/J.1463-5224.2011.00917.X>
- Giuliano, E. A., Moore, C. P., & Phillips, T. E. (2002). Morphological evidence of M cells in healthy canine conjunctiva-associated lymphoid tissue. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 240(3), 220–226. <https://doi.org/10.1007/S00417-002-0429-3>
- Goldmann, W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Veterinary Research*, 39(4). <https://doi.org/10.1051/vetres:2008010>
- González, L., Anderson, I., Deane, D., Summers, C., & Buxton, D. (2001). Detection of immune system cells in paraffin wax-embedded ovine tissues. *Journal of Comparative Pathology*, 125(1), 41–47. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0475>
- González, L., Dagleish, M. P., Bellworthy, S. J., Sisó, S., Stack, M. J., Chaplin, M. J., Davis, L. A., Hawkins, S. A. C., Hughes, J., & Jeffrey, M. (2006). Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *The Veterinary Record*, 158(10), 325–330. <https://doi.org/10.1136/VR.158.10.325>

- Gonzalez, L., Dagleish, M. P., Martin, S., Dexter, G., Steele, P., Finlayson, J., & Jeffrey, M. (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Veterinary Record*, 162(13), 397–403. <https://doi.org/10.1136/vr.162.13.397>
- González, L., Martin, S., Hawkins, S. A. C., Goldmann, W., Jeffrey, M., & Sisó, S. (2010). Pathogenesis of natural goat scrapie: modulation by host PRNP genotype and effect of co-existent conditions. *Veterinary Research*, 41(4), 48. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010020>
- Greenlee, J. J. (2019). Review: Update on Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. *Veterinary Pathology*, 56(1), 6–16. <https://doi.org/10.1177/0300985818794247>
- Greig, J. R. (1940). Observations on the Transmission of the Disease by Mediate Contact. *The Veterinary Journal (1900)*, 96(5), 203–206. [https://doi.org/10.1016/s0372-5545\(17\)35058-7](https://doi.org/10.1016/s0372-5545(17)35058-7)
- Groschup, M., & Langeveld, J. P. (2019). *OIE rules for the official confirmation of BSE in bovines*. <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/test.html>
- Haley, N. J., Seelig, D. M., Zabel, M. D., Telling, G. C., & Hoover, E. A. (2009). Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS ONE*, 4(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004848>
- Halliday, S., Houston, F., & Hunter, N. (2005). Expression of PrPC on cellular components of sheep blood. *Journal of General Virology*, 86(5), 1571–1579. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80561-0/CITE/REFWORKS>
- Hannaoui, S., Schatzl, H. M., & Gilch, S. (2017). Chronic wasting disease: Emerging prions and their potential risk. *PLoS Pathogens*, 13(11), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006619>
- Hanson, R. P., Eckroade, R. J., Marsh, R. F., Zu Rhein, G. M., Kanitz, C. L., & Gustafson, D. P. (1971). Susceptibility of mink to sheep scrapie. *Science*, 172(3985), 859–861. <https://doi.org/10.1126/science.172.3985.859>
- Hartsough, G. R., & Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink: I. Epizootiologic and clinical observations. *Journal of Infectious Diseases*, 115(4), 387–392. <https://doi.org/10.1093/infdis/115.4.387>
- Heggebø, R., González, L., Press, C. M. L., Gunnes, G., Espenes, A., & Jeffrey, M. (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *Journal of General Virology*, 84(5), 1327–1338. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18874-0>

- Heggebø, R., Press, C. M. L., Gunnes, G., González, L., & Jeffrey, M. (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *Journal of General Virology*, *83*(2), 479–489. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-479>
- Henderson, D. M., Manca, M., Haley, N. J., Denkers, N. D., Nalls, A. V., Mathiason, C. K., Caughey, B., & Hoover, E. A. (2013). Rapid Antemortem Detection of CWD Prions in Deer Saliva. *PLoS ONE*, *8*(9), e74377. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074377>
- Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J.-P., & Aguzzi, A. (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nature Medicine*, *7*(9), 976–977. <https://doi.org/10.1038/nm0901-976>
- Herrmann, L. M., Cheevers, W. P., Davis, W. C., Knowles, D. P., & O'Rourke, K. I. (2003). Cd21-positive follicular dendritic cells: A possible source of PrP^{Sc} in lymph node macrophages of scrapie-infected sheep. *American Journal of Pathology*, *162*(4), 1075–1081. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63904-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63904-1)
- Hicks, D. J., Johnson, L., Mitchell, S. M., Gough, J., Cooley, W. A., La Ragione, R. M., Spencer, Y. I., & Wangoo, A. (2006). Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotechnic and Histochemistry*, *81*(1), 23–30. <https://doi.org/10.1080/10520290600725375>
- Hoffmann, C., Eiden, M., Kaatz, M., Keller, M., Ziegler, U., Rogers, R., Hills, B., Balkema-Buschmann, A., Van Keulen, L., Jacobs, J. G., & Groschup, M. H. (2011). BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Veterinary Research*, *42*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-21>
- Hoffmann, C., Ziegler, U., Buschmann, A., Weber, A., Kupfer, L., Oelschlegel, A., Hammerschmidt, B., & Groschup, M. H. (2007). Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *Journal of General Virology*, *88*(3), 1048–1055. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82186-0>
- Hoinville, L. J., Tongue, S. C., & Wilesmith, J. W. (2010). *Evidence for maternal transmission of scrapie in naturally affected flocks.* *93*, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.10.013>
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wüthrich, K., & Glockshuber, R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23–231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Letters*, *413*(2), 277–281. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00921-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00921-6)

- Huang, F. P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E., & Macpherson, G. G. (2002). *Migrating intestinal dendritic cells transport PrP Sc from the gut*. 267–271.
- Huang, F. P., & MacPherson, G. G. (2004). Dendritic cells and oral transmission of prion diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(6), 901–913. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.09.006>
- Imai, Y., & Yamakawa, M. (1996). Morphology, function and pathology of follicular dendritic cells. *Pathology International*, 46(11), 807–833. <https://doi.org/10.1111/J.1440-1827.1996.TB03555.X>
- Jarrige, N., Ducrot, C., Cazeau, G., Morignat, E., La Bonnardière, C., & Calavas, D. (2007). Case-control study on feed risk factors for BSE cases born after the feed ban in France. *Veterinary Research*, 38(3), 505–516. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007011>
- Jeffrey, M., & González, L. (2004). Pathology and Pathogenesis of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 284, 65–97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08441-0_3/COVER
- Jeffrey, M., Martin, S., González, L., Foster, J. D., Langeveld, J. P. M., van Zijderveld, F. G., Grassi, J., & Hunter, N. (2006). Immunohistochemical Features of PrPd Accumulation in Natural and Experimental Goat Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Journal of Comparative Pathology*, 134(2–3), 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.003>
- Jeffrey, M., Ryder, S., Martin, S., Hawkins, S. A. C., Terry, L., Berthelin-Baker, C., & Bellworthy, S. J. (2001). Oral Inoculation of Sheep with the Agent of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). 1. Onset and Distribution of Disease-specific PrP Accumulation in Brain and Viscera. *Journal of Comparative Pathology*, 124(4), 280–289. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0465>
- Jeffrey, M., Scott, J. R., Williams, A., & Fraser, H. (1992). Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathologica*, 84(5), 559–569. <https://doi.org/10.1007/BF00304476>
- Jeffrey, M., Witz, J. P., Martin, S., Hawkins, S. A. C., Bellworthy, S. J., Dexter, G. E., Thurston, L., & González, L. (2015). Dynamics of the natural transmission of bovine spongiform encephalopathy within an intensively managed sheep flock. *Veterinary Research*, 46(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0269-x>
- John, T. R., Schätzl, H. M., & Gilch, S. (2013). Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion*, 7(3), 253–258. <https://doi.org/10.4161/pri.24430>
- Keane, D., Barr, D., Osborn, R., Langenberg, J., O'Rourke, K., Schneider, D., & Bochsler, P. (2009). Validation of Use of Rectoanal Mucosa-Associated Lymphoid Tissue for

- Immunohistochemical Diagnosis of Chronic Wasting Disease in White-Tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Clinical Microbiology*, 47(5), 1412. <https://doi.org/10.1128/JCM.02209-08>
- Kim, S. H., Kook, M. C., & Song, H. G. (2004). Optimal conditions for the retrieval of CD4 and CD8 antigens in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Histology*, 35(4), 403–408. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000039856.43632.66>
- Kirkwood, J. K., & Cunningham, A. A. (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Veterinary Record*, 135(13), 296 LP – 303. <https://doi.org/10.1136/vr.135.13.296>
- Kittelberger, R., Chaplin, M. J., Simmons, M. M., Ramirez-Villaescusa, A., McIntyre, L., MacDiarmid, S. C., Hannah, M. J., Jenner, J., Bueno, R., Bayliss, D., Black, H., Pigott, C. J., & O’Keefe, J. S. (2010). Atypical scrapie/nor98 in a sheep from new Zealand. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(6), 863–875. <https://doi.org/10.1177/104063871002200604>
- Konold, T., Davis, A., Bone, G., Bracegirdle, J., Everitt, S., Chaplin, M., Saunders, G. C., Cawthraw, S., & Simmons, M. M. (2007). Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Veterinary Research*, 3, 2. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-2>
- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., & Simmons, H. A. (2008). Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Veterinary Research*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-14>
- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Terry, L. A., Thorne, L., Ramsay, A., Salguero, F. J., Simmons, M. M., & Simmons, H. A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Veterinary Research*, 9(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-99>
- Konold, T., Spiropoulos, J., Thorne, J., Phelan, L., Fothergill, L., Rajanayagam, B., Floyd, T., Vidana, B., Charnley, J., Coates, N., & Simmons, M. (2020). The Scrapie Prevalence in a Goat Herd Is Underestimated by Using a Rapid Diagnostic Test. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00164>
- Konold, T., Thorne, L., Simmons, H. A., Hawkins, S. A. C., Simmons, M. M., & González, L. (2016). Evidence of scrapie transmission to sheep via goat milk. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0807-4>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordoñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Skandamis, P., Suffredini, E., Andreoletti, O., Benestad, S. L., Comoy, E., ... Simmons, M. M.

- (2019). Update on chronic wasting disease (CWD) III. *EFSA Journal*, 17(11). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5863>
- Kurshumliu, F., Sadiku-Zehri, F., Qerimi, A., Vela, Z., Jashari, F., Bytyci, S., Rashiti, V., & Sadiku, S. (2019). Divergent immunohistochemical expression of CD21 and CD23 by follicular dendritic cells with increasing grade of follicular lymphoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/S12957-019-1659-8>
- Lacey, R. W., & Dealler, S. F. (1994). The transmission of prion disease: Vertical transmission of prion disease. *Human Reproduction*, 9(10), 1796–1797. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138335>
- Lacroux, C., Corbière, F., Tabouret, G., Lugan, S., Costes, P., Mathey, J., Delamas, J. M., Weisbecker, J. L., Foucras, G., Cassard, H., Elsen, J. M., Schelcher, F., & Andréoletti, O. (2007). Dynamics and genetics of PrP^{Sc} placental accumulation in sheep. *Journal of General Virology*, 88(3), 1056–1061. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82218-0>
- Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbière, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., & Andréoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathogens*, 4(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000238>
- Larsson, A., & Sjöquist, J. (1990). Chicken IgY: utilizing the evolutionary difference. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 13(4), 199–201. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90088-B](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90088-B)
- Le Dur, A., Béringue, V., Andréoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L., & Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(44), 16031–16036. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502296102>
- Leal, J. S., Correa, G. L. F., Boos, G. S., Bianchi, M. V., Boabaid, F. M., Lopes, R. F. F., & Driemeier, D. (2015). Scrapie diagnosis in a goat and four Santa Inês sheep from the same herd in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, 6, 1625–1629. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7981>
- Liberski, P. P. (2012). Historical overview of prion diseases: A view from afar. *Folia Neuropathologica*, 50(1), 1–12.
- Liebler-Tenorio, E. M., & Pabst, R. (2006). MALT structure and function in farm animals. *Veterinary Research*, 37(3), 257–280. <https://doi.org/10.1051/VETRES:2006001>

- Ligos, C., Cancedda, M. G., Carta, A., Santucci, C., Maestrale, C., Demontis, F., Saba, M., Patta, C., DeMartini, J. C., Aguzzi, A., & Sigurdson, C. J. (2011). Sheep with Scrapie and Mastitis Transmit Infectious Prions through the Milk. *Journal of Virology*, *85*(2), 1136–1139. <https://doi.org/10.1128/jvi.02022-10>
- Lombardi, G., Casalone, C., D'Angelo, A., Gelmetti, D., Torcoli, G., Barbieri, I., Corona, C., Fasoli, E., Farinazzo, A., Fiorini, M., Gelati, M., Iulini, B., Tagliavini, F., Ferrari, S., Caramelli, M., Monaco, S., Capucci, L., & Zanusso, G. (2008). Intraspecies Transmission of BASE Induces Clinical Dullness and Amyotrophic Changes. *PLoS Pathogens*, *4*(5), e1000075. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000075>
- Luna, L. (1968). *Manual of staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (3rd ed.). Mc Graw- Hill.
- Mabbott, N. A., Williams, A., Farquhar, C. F., Pasparakis, M., Kollias, G., & Bruce, M. E. (2000). Tumor Necrosis Factor Alpha-Deficient, but Not Interleukin-6-Deficient, Mice Resist Peripheral Infection with Scrapie. *Journal of Virology*, *74*(7), 3338–3344. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3338-3344.2000>
- Maddison, B. C., Rees, H. C., Baker, C. A., Taema, M., Bellworthy, S. J., Thorne, L., Terry, L. A., & Gough, K. C. (2010). Prions Are Secreted into the Oral Cavity in Sheep with Preclinical Scrapie. *The Journal of Infectious Diseases*, *201*(11), 1672–1676. <https://doi.org/10.1086/652457>
- Maddox, J. F., Mackay, C. R., & Brandon, M. R. (1985). Surface antigens, SBU-T4 and SBU-T8, of sheep T lymphocyte subsets defined by monoclonal antibodies. *Immunology*, *55*(4), 739. [/pmc/articles/PMC1453767/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1453767/)
- Madec, J. Y., Groschup, M. H., Buschmann, A., Belli, P., Calavas, D., & Baron, T. (1998). Sensitivity of the Western blot detection of prion protein PrPres in natural sheep scrapie. *Journal of Virological Methods*, *75*(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(98\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00113-X)
- Mahajan, A., Naylor, S., Mills, A. D., Low, J. C., Mackellar, A., Hoey, D. E. E., Currie, C. G., Gally, D. L., Huntley, J., & Smith, D. G. E. (2005). Phenotypic and functional characterisation of follicle-associated epithelium of rectal lymphoid tissue. *Cell and Tissue Research*, *321*(3), 365–374. <https://doi.org/10.1007/S00441-005-1080-1/FIGURES/4>
- Mathiason, C. K., Hays, S. A., Powers, J., Hayes-Klug, J., Langenberg, J., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., & Hoover, E. A. (2009). Infectious Prions in Pre-Clinical Deer and Transmission of Chronic Wasting Disease Solely by Environmental Exposure. *PLoS ONE*, *4*(6), e5916. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005916>

- Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C., & Hoover, E. A. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science*, *314*(5796), 133–136. <https://doi.org/10.1126/science.1132661>
- McBride, P. A., Eikelenboom, P., Kraal, G., Fraser, H., & Bruce, M. E. (1992). PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *The Journal of Pathology*, *168*(4), 413–418. <https://doi.org/10.1002/path.1711680412>
- McBride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H. A., & Beekes, M. (2001). Early Spread of Scrapie from the Gastrointestinal Tract to the Central Nervous System Involves Autonomic Fibers of the Splanchnic and Vagus Nerves. *Journal of Virology*, *75*(19), 9320–9327. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.19.9320-9327.2001>
- Mead, S., Lloyd, S., & Collinge, J. (2019). Genetic Factors in Mammalian Prion Diseases. *Annual Review of Genetics*, *53*(1), 117–147. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120213-092352>
- Meek, H. C., Stenfeldt, C., & Arzt, J. (2022). Morphological and Phenotypic Characteristics of the Bovine Nasopharyngeal Mucosa and Associated Lymphoid Tissue. *Journal of Comparative Pathology*, *198*, 62–79. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2022.07.011>
- Melchior, M. B., Windig, J. J., Hagenaaars, T. J., Bossers, A., Davidse, A., & van Zijderveld, F. G. (2010). Eradication of scrapie with selective breeding: Are we nearly there? *BMC Veterinary Research*, *6*. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-24>
- Meyer, R. K., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Braunfeld, M. B., Barry, R. A., & Prusiner, S. B. (1986). Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *83*(8), 2310–2314. <https://doi.org/10.1073/PNAS.83.8.2310>
- Micklem, K., Rigney, E., Cordell, J., Simmons, D., Stross, P., Turley, H., Seed, B., & Mason, D. (1989). A human macrophage-associated antigen (CD68) detected by six different monoclonal antibodies. *British Journal of Haematology*, *73*(1), 6–11. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2141.1989.TB00210.X>
- Miller, M. W., & Williams, E. S. (2003). Horizontal prion transmission in mule deer. *Nature*, *425*(6953), 35–36. <https://doi.org/10.1038/425035a>
- Ministerio del Agro y la Producción de la Provincia de Misiones. (2020). *Planillas de Exposición de Ovinos y Caprinos*. <https://agro.misiones.gob.ar/novedades/>

- Miyazawa, K., Kanaya, T., Takakura, I., Tanaka, S., Hondo, T., Watanabe, H., Rose, M. T., Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Katamine, S., Nishida, N., & Aso, H. (2010). Transcytosis of Murine-Adapted Bovine Spongiform Encephalopathy Agents in an In Vitro Bovine M Cell Model. *Journal of Virology*, *84*(23), 12285–12291. <https://doi.org/10.1128/jvi.00969-10>
- Miyazawa, K., Kanaya, T., Tanaka, S., Takakura, I., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M. T., Sakaguchi, S., Katamine, S., Yamaguchi, T., & Aso, H. (2007). Immunohistochemical characterization of cell types expressing the cellular prion protein in the small intestine of cattle and mice. *Histochemistry and Cell Biology*, *127*(3), 291–301. <https://doi.org/10.1007/S00418-006-0250-X>
- Mok, S. W. F., Proia, R. L., Brinkmann, V., & Mabbott, N. A. (2012). B Cell-Specific S1PR1 Deficiency Blocks Prion Dissemination between Secondary Lymphoid Organs. *The Journal of Immunology*, *188*(10), 5032–5040. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200349>
- Monleón, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Álvarez-Rodríguez, J., Bolea, R., Monzón, M., Vargas, M. A., Badiola, J. J., & Acín, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Veterinary Microbiology*, *147*(3–4), 237–243. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2010.06.028>
- Moore, S. J., Simmons, M., Chaplin, M., & Spiropoulos, J. (2008). Neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in naturally occurring atypical scrapie cases in Great Britain. *Acta Neuropathologica*, *116*(5), 547–559. <https://doi.org/10.1007/S00401-008-0433-8>
- Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Moum, T., & Benestad, S. L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *Journal of General Virology*, *86*(1), 231–235. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80437-0>
- Naessens, J., Newson, J., Mchugh, N., Howard, C. J., Parsons, K., & Jones, B. (1990). Characterization of a bovine leucocyte differentiation antigen of 145,000 MW restricted to B lymphocytes. *Immunology*, *69*, 525–530.
- Nakamura, Y., Kimura, S., & Hase, K. (2018). M cell-dependent antigen uptake on follicle-associated epithelium for mucosal immune surveillance. *Inflammation and Regeneration*, *38*(1). <https://doi.org/10.1186/S41232-018-0072-Y>
- Nalls, A. V., McNulty, E., Hoover, C. E., Pulscher, L. A., Hoover, E. A., & Mathiason, C. K. (2017). Infectious Prions in the Pregnancy Microenvironment of Chronic Wasting Disease-Infected Reeves' Muntjac Deer. *Journal of Virology*, *91*(15), 1–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.00501-17>
- Nalls, A. V., McNulty, E., Powers, J., Seelig, D. M., Hoover, C., Haley, N. J., Hayes-Klug, J., Anderson, K., Stewart, P., Goldmann, W., Hoover, E. A., & Mathiason, C. K. (2013). Mother

- to Offspring Transmission of Chronic Wasting Disease in Reeves' Muntjac Deer. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071844>
- Nanney, L. B., Woodrell, C. D., Greives, M. R., Cardwell, N. L., Pollins, A. C., Bancroft, T. A., Chesser, A., Michalak, M., Rahman, M., Siebert, J. W., & Gold, L. I. (2008). Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *The American Journal of Pathology*, 173(3), 610–630. <https://doi.org/10.2353/AJPATH.2008.071027>
- Nentwig, A., Oevermann, A., Heim, D., Botteron, C., Zellweger, K., Drögemüller, C., Zurbriggen, A., & Seuberlich, T. (2007). Diversity in neuroanatomical distribution of abnormal prion protein in atypical scrapie. *PLoS Pathogens*, 3(6), 0743–0751. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030082>
- Okada, H., Iwamaru, Y., Imamura, M., Miyazawa, K., Matsuura, Y., Masujin, K., Murayama, Y., & Yokoyama, T. (2017). Oral transmission of L-type bovine spongiform encephalopathy agent among cattle. *Emerging Infectious Diseases*, 23(2), 284–287. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161416>
- Okada, H., Murayama, Y., Shimosaki, N., Yoshioka, M., Masujin, K., Imamura, M., Iwamaru, Y., Matsuura, Y., Miyazawa, K., Fukuda, S., Yokoyama, T., & Mohri, S. (2012). Prion in Saliva of Bovine Spongiform Encephalopathy- Infected Cattle. *Emerging Infectious Diseases*, 18(12), 2091–2092. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120528>
- OMSA. (2022). *Organización Mundial de Sanidad Animal*. Prurigo Lumbar. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.08.11_SCRAPIE.pdf
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2020). *BSE situation in the world and annual incidence rate*. <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/test-bse-situation-in-the-world-and-annual-incidence-rate-copy-1>
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2022). Encefalopatía Espongiforme Bovina. *Código Sanitario Para Los Animales Terrestres*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_bse.pdf
- O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Besser, T. E., Miller, J. M., Cutlip, R. C., Wells, G. A. H., Ryder, S. J., Parish, S. M., Hamir, A. N., Cockett, N. E., Jenny, A., & Knowles, D. P. (2000). Preclinical Diagnosis of Scrapie by Immunohistochemistry of Third Eyelid Lymphoid Tissue. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3254–3259. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3254-3259.2000>
- O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Miller, J. M., Spraker, T. R., Sadler-Riggelman, I., & Knowles, D. P. (1998). Monoclonal Antibody F89/160.1.5 Defines a Conserved Epitope on the Ruminant

- Prion Protein. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), 1750. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.6.1750-1755.1998>
- O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Parish, S. M., & Knowles, D. P. (1998). Preclinical detection of PrPSc in nictitating membrane lymphoid tissue of sheep. *The Veterinary Record*, 142(18), 489–491. <https://doi.org/10.1136/VR.142.18.489>
- O'Rourke, K. I., Duncan, J. V., Logan, J. R., Anderson, A. K., Norden, D. K., Williams, E. S., Combs, B. A., Stobart, R. H., Moss, G. E., & Sutton, D. L. (2002). Active Surveillance for Scrapie by Third Eyelid Biopsy and Genetic Susceptibility Testing of Flocks of Sheep in Wyoming. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(5), 966. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.966-971.2002>
- O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Truscott, T. C., Yan, H., & Schneider, D. A. (2011). Sparse PrP(Sc) accumulation in the placentas of goats with naturally acquired scrapie. *BMC Veterinary Research*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-7-7>
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 10962–10966. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10962>
- Park, C. S., & Choi, Y. S. (2005). How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*, 114(1), 2–10. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2567.2004.02075.X>
- Park, J. I., Cho, S. W., Kang, J. H., & Park, T. E. (2023). Intestinal Peyer's Patches: Structure, Function, and In Vitro Modeling. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.1007/S13770-023-00543-Y>
- Pattison, I. H., Hoare, M., Jebbett, J., & Watson, W. (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Veterinary Record*, 90(17), 465–468. <https://doi.org/10.1136/vr.90.17.465>
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N., & Watson, W. A. (1974). Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie affected sheep. *British Veterinary Journal*, 130(4). [https://doi.org/10.1016/S0007-1935\(17\)35851-7](https://doi.org/10.1016/S0007-1935(17)35851-7)
- Paul, M., Abrial, D., Jarrige, N., Rican, S., Garrido, M., Calavas, D., & Ducrot, C. (2007). Bovine Spongiform Encephalopathy and Spatial Analysis of the Feed Industry. *Emerging Infectious Diseases*, 13(6), 867–872. <https://doi.org/10.3201/eid1306.061169>

- Pérez, J., Mozos, E., Martín, M. P., & Day, M. J. (1999). Immunohistochemical Study of the Inflammatory Infiltrate Associated with Equine Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Comparative Pathology*, *121*(4), 385–397. <https://doi.org/10.1053/JCPA.1999.0336>
- Peter, J. F., & Otto, A. M. (2010). Magnetic particles as powerful purification tool for high sensitive mass spectrometric screening procedures. *Proteomics*, *10*(4), 628–633. <https://doi.org/10.1002/PMIC.200900535>
- Porter, D. D., Porter, H. G., & Cox, N. A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *111*(5), 1407–1410.
- Pottgiesser, C., Ovelhey, A., Ziller, M., Kramer, M., Selhorst, T., & Conraths, F. J. (2006). Potential Risk Factors Associated with Bovine Spongiform Encephalopathy in Cattle from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Veterinary Medicine Series B*, *53*(7), 306–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2006.00960.x>
- Priemer, G., Balkema-Buschmann, A., Hills, B., & Groschup, M. H. (2013). Biochemical Characteristics and PrPSc Distribution Pattern in the Brains of Cattle Experimentally Challenged with H-type and L-type Atypical BSE. *PLoS ONE*, *8*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067599>
- Pringle, E. S., Firth, M. A., Chattha, K. S., Hodgins, D. C., & Shewen, P. E. (2012). Expression of complement receptors 1 (CR1/CD35) and 2 (CR2/CD21), and co-signaling molecule CD19 in cattle. *Developmental & Comparative Immunology*, *38*(4), 487–494. <https://doi.org/10.1016/J.DCI.2012.08.003>
- Prinz, M., Huber, G., Macpherson, A. J. S., Heppner, F. L., Glatzel, M., Eugster, H. Pietro, Wagner, N., & Aguzzi, A. (2003). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *American Journal of Pathology*, *162*(4), 1103–1111. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63907-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63907-7)
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136–144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(23), 13363–13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>
- Pugh, D. G., & Baird, A. N. (2012). Sheep and Goat Medicine. *Sheep and Goat Medicine*. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-60474-8>
- Pulford, B., Spraker, T. R., Christy Wyckoff, A., Meyerett, C., Bender, H., Ferguson, A., Wyatt, B., Lockwood, K., Powers, J., Telling, G. C., Wild, M. A., & Zabel, M. D. (2012). Detection of PrPCWD in feces from naturally exposed Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*)

- using protein misfolding cyclic amplification. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(2), 425–434. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-48.2.425>
- Race, B. L., Meade-White, K. D., Ward, A., Jewell, J., Miller, M. W., Williams, E. S., Chesebro, B., & Race, R. E. (2007). Levels of abnormal prion protein in deer and elk with chronic wasting disease. *Emerging Infectious Diseases*, 13(6), 824–830. <https://doi.org/10.3201/eid1306.070186>
- Ramos-Vara, J. A., & Miller, M. A. (2014). When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry-The Red, Brown, and Blue Technique. *Veterinary Pathology*, 51(1), 42–87. <https://doi.org/10.1177/0300985813505879>
- Rezaei, H., Marc, D., Choiset, Y., Takahashi, M., Hui Bon Hoa, G., Haertlé, T., Grosclaude, J., & Debey, P. (2000). High yield purification and physico-chemical properties of full-length recombinant allelic variants of sheep prion protein linked to scrapie susceptibility. *European Journal of Biochemistry*, 267(10), 2833–2839. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2000.01347.X>
- Rezk, S. A., Nathwani, B. N., Zhao, X., & Weiss, L. M. (2013). Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Human Pathology*, 44(6), 937–950. <https://doi.org/10.1016/J.HUMPATH.2012.10.005>
- Rivera, N. A., Brandt, A. L., Novakofski, J. E., & Mateus-Pinilla, N. E. (2019). <p>Chronic Wasting Disease In Cervids: Prevalence, Impact And Management Strategies</p>. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, Volume 10, 123–139. <https://doi.org/10.2147/vmrr.s197404>
- Roh, I. S., Kim, Y. C., Kim, H. J., Won, S. Y., Jeong, M. J., Kang, H. E., Sohn, H. J., & Jeong, B. H. (2020). Identification of the prion-related protein gene (PRNT) sequences in various species of the Cervidae family. *Molecular Biology Reports*, 47(8), 6155–6164. <https://doi.org/10.1007/S11033-020-05697-9>
- Rubenstein, R., Chang, B., Gray, P., Piltch, M., Bulgin, M. S., Sorensen-Melson, S., & Miller, M. W. (2011). Prion Disease Detection, PMCA Kinetics, and IgG in Urine from Sheep Naturally/Experimentally Infected with Scrapie and Deer with Preclinical/Clinical Chronic Wasting Disease. *Journal of Virology*, 85(17), 9031–9038. <https://doi.org/10.1128/jvi.05111-11>
- Rubenstein, R., Kascsak, R. J., Papini, M., Kascsak, R., Carp, R. I., LaFauci, G., Meloen, R., & Langeveld, J. (1999). Immune surveillance and antigen conformation determines humoral immune response to the prion protein immunogen. *Journal of Neurovirology*, 5(4), 401–413. <https://doi.org/10.3109/13550289909029481>

- Sala, C., Morignat, E., Oussaïd, N., Gay, E., Abrial, D., Ducrot, C., & Calavas, D. (2012). Individual factors associated with L- and H-type Bovine Spongiform Encephalopathy in France. *BMC Veterinary Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-74>
- Salazar, E., Monleón, E., Bolea, R., Acín, C., Pérez, M., Álvarez, N., Leginagoikoa, I., Juste, R., Minguijón, E., Reina, R., Glaria, I., Berriatua, E., de Andrés, D., Badiola, J. J., Amorena, B., & Luján, L. (2010). Detection of PrP Sc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Veterinary Research*, 41(5), 58. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010030>
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2da ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sawada, K., Suzuki, A., Yamasaki, T., Iwamaru, Y., Matsuura, Y., Miyazawa, K., Masujin, K., Atarashi, R., & Horiuchi, M. (2019). Estimation of prion infectivity in tissues of cattle infected with atypical BSE by real time-quaking induced conversion assay. *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(6), 846–850. <https://doi.org/10.1292/jvms.19-0003>
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., & Terzolo, H. R. (2005). Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): A review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. In *ATLA Alternatives to Laboratory Animals* (Vol. 33, Issue 2, pp. 129–154). Altern Lab Anim. <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>
- Schlegel, T., Brehm, H., & Amselgruber, W. M. (2001). The cartilage of the third eyelid: A comparative macroscopical and histological study in domestic animals. *Annals of Anatomy*, 183(2), 165–169. [https://doi.org/10.1016/S0940-9602\(01\)80041-8](https://doi.org/10.1016/S0940-9602(01)80041-8)
- Schleuder, B. E. C., Van Keulen, L. J. M., Vromans, M. E. W., Langeveld, J. P. M., & Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *The Veterinary Record*, 142(21), 564–568. <https://doi.org/10.1136/VR.142.21.564>
- Schneider, D. A., Madsen-Bouterse, S. A., Zhuang, D., Truscott, T. C., Dassanayake, R. P., & O'Rourke, K. I. (2015). The placenta shed from goats with classical scrapie is infectious to goat kids and lambs. *Journal of General Virology*, 96(8), 2464–2469. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000151>
- Schudel, A. A., Carrillo, B. J., Weber, E. L., Blanco Viera, J., Gimeno, E. J., Van Gelderen, C., Ulloa, E., Nader, A., Cané, B. G., & Kimberlin, R. H. (1996). Analysis of Risk Factors and Active Surveillance for BSE in Argentina. *Bovine Spongiform Encephalopathy*, 138–154. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-2406-8_12
- Schwabenlander, M. D., Culhane, M. R., Hall, S. M., Goyal, S. M., Anderson, P. L., Carstensen, M., Wells, S. J., Slade, W. B., & Armién, A. G. (2013). A case of chronic wasting disease in a

- captive red deer (*Cervus elaphus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25(5), 573–576. <https://doi.org/10.1177/1040638713499914>
- Schwermer, H., Forster, K., Brülisauer, F., Chaubert, C., & Heim, D. (2007). BSE, feed and cattle in Switzerland: Is there a spatial relation? *Veterinary Research*, 38(3), 409–418. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007005>
- Schwinzer, R., Sommermeyer, H., Schlitt, H. J., Schmidt, R. E., & Wonigeit, K. (1991). Activation of human thymocytes by antibodies to the CD3/T-cell receptor complex: Triggering of different epitopes results in different signals. *Cellular Immunology*, 136(2), 318–328. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90355-F](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90355-F)
- Sedgmen, B. J., Lofthouse, S. A., Scheerlinck, J. P. Y., & Meeusen, E. N. T. (2002). Cellular and molecular characterisation of the ovine rectal mucosal environment. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 86(3–4), 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00011-9)
- Seelert, H., & Krause, F. (2008). Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels. In *Electrophoresis* (Vol. 29, Issue 12, pp. 2617–2636). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/elps.200800061>
- Selariu, A., Powers, J. G., Nalls, A., Brandhuber, M., Mayfield, A., Fullaway, S., Wyckoff, C. A., Goldmann, W., Zabel, M. M., Wild, M. A., Hoover, E. A., & Mathiason, C. K. (2015). In utero transmission and tissue distribution of chronic wasting disease-associated prions in free-ranging Rocky Mountain elk. *Journal of General Virology*, 96(11), 3444–3455. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000281>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2001). *Resolución-238-2001-SENASA*. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-238-2001-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2003). *Resolución-10-2003-SENASA*. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-10-2003-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2015). *Resolución-238-2015-SENASA*. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-238-2015-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2016). *Ovinos: Informes y estadísticas / SENASA*. <http://www.senasa.gob.ar/cadena-animal/ovinos/informacion/informes-y-estadisticas>

- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2017). *Caprinos: Informes y estadísticas* / SENASA. <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/caprinos/informacion/informes-y-estadisticas>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2019a). *RESOL-2019-974-APN-PRES#SENASA*. <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-974-2019-326522/texto>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2019b). *Resolución 733/2019*. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/210020/20190625>
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. (2023). *Enfermedades espongiiformes transmisibles (EET)* / SENASA. <http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/bovinos-y-bubalinos/produccion-primaria/sanidad-animal/enfermedades-y-estra-sani/enfermedades-espongiiformes-transmisibles-eet>
- Sigurdson, C. J., Barillas-Mury, C., Miller, M. W., Oesch, B., van Keulen, L. J. M., Langeveld, J. P. M., & Hoover, E. A. (2002). PrPCWD lymphoid cell targets in early and advanced chronic wasting disease of mule deer. *Journal of General Virology*, 83(10), 2617–2628. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2617>
- Sigurdson, C. J., Spraker, T. R., Miller, M. W., Oesch, B., & Hoover, E. A. (2001). PrPCWD in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease. *Journal of General Virology*, 82(10), 2327–2334. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2327>
- Sigurdson, C. J., Williams, E. S., Miller, M. W., Spraker, T. R., O'Rourke, K. I., & Hoover, E. A. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrP(res) in mule deer fawns (*Odocoileus hemionus*). *Journal of General Virology*, 80(10), 2757–2764. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2757>
- Simmons, M. M., Jo Moore, S., Konold, T., Thurston, L., Terry, L. A., Thorne, L., Lockey, R., Vickery, C., Hawkins, S. A. C., Chaplin, M. J., & Spiropoulos, J. (2011). Experimental oral transmission of atypical scrapie to sheep. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5), 848–854. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101654>
- Simmons, M. M., Konold, T., Simmons, H. A., Spencer, Y. I., Lockey, R., Spiropoulos, J., Everitt, S., & Clifford, D. (2007). Experimental transmission of atypical scrapie to sheep. *BMC Veterinary Research*, 3, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-3-20>
- Sørby, R., Austbø, L., Press, C. M. L., Skretting, G., Landsverk, T., & Espenes, A. (2009). PrP expression, PrPSc accumulation and innervation of splenic compartments in sheep experimentally infected with scrapie. *PLoS One*, 4(9). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0006885>

- Spiropoulos, J., Casalone, C., Caramelli, M., & Simmons, M. M. (2007). Immunohistochemistry for PrP^{Sc} in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 33(4), 398–409. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2990.2007.00800.X>
- Spraker, T. R., Gidlewski, T. L., Balachandran, A., VerCauteren, K. C., Creekmore, L., & Munger, R. D. (2006). Detection of PrP(CWD) in postmortem rectal lymphoid tissues in Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) infected with chronic wasting disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.*, 18(6), 553–557. <https://doi.org/10.1177/104063870601800605>
- Spraker, T. R., O’rourke, K. I., Balachandran, A., Zink, R. R., Cummings, B. A., Miller, M. W., & Powers, B. E. (2002). Validation of monoclonal antibody F99/97.6.1 for immunohistochemical staining of brain and tonsil in mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J Vet Diagn Invest*, 14, 3–7.
- Stack, M. J. (2004). Western Immunoblotting Techniques for the Study of Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Techniques in Prion Research*, 97–116. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7949-1_8
- Steven, P., & Gebert, A. (2009). Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue – Current Knowledge, Animal Models and Experimental Prospects. *Ophthalmic Research*, 42(1), 2–8. <https://doi.org/10.1159/000219678>
- Stevenson, M. A., Morris, R. S., Lawson, A. B., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. M., & Jackson, R. (2005). Area-level risks for BSE in British cattle before and after the July 1988 meat and bone meal feed ban. *Preventive Veterinary Medicine*, 69(1–2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.01.016>
- Tamgüney, G., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Glidden, D. V., Palmer, C., Lemus, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2009). Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature*, 461(7263), 529–532. <https://doi.org/10.1038/nature08289>
- Tamgüney, G., Richt, J. A., Hamir, A. N., Greenlee, J. J., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Young, A. J., Glidden, D. V., Johnson, N. L., Giles, K., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2012). Salivary prions in sheep and deer. *Prion*, 6(1), 52–61. <https://doi.org/10.4161/pri.6.1.16984>
- Tannenbaum, J., & Bennett, B. T. (2015). Russell and Burch’s 3Rs Then and Now: The Need for Clarity in Definition and Purpose. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 54(2), 120. [/pmc/articles/PMC4382615/](https://doi.org/10.1002/lab.120)

- Terry, L. A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C. A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B. C., & Gough, K. C. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Veterinary Research*, 42(1), 65. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-65>
- Terry, L. A., Marsh, S., Ryder, S. J., Hawkins, S. A. C., Wells, G. A. H., & Spencer, Y. I. (2003). Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record*, 152(13), 387 LP – 392. <https://doi.org/10.1136/vr.152.13.387>
- Thielen, C., Antoine, N., Mélot, F., Cesbron, J. Y., Heinen, E., & Tsunoda, R. (2001). Human FDC express PrP^C in vivo and in vitro. *Developmental Immunology*, 8(3–4), 259–266. <https://doi.org/10.1155/2001/45454>
- Thuring, C. M. A., McElroy, M. C., Sweeney, T., & Weavers, E. (2000). Suitability of protuberances on the third eyelids of sheep as a biopsy site for lymphoid follicles. *The Veterinary Record*, 147(22), 631–632. <https://doi.org/10.1136/VR.147.22.631>
- Thuring, C. M. A., van Keulen, L. J. M., Langeveld, J. P. M., Vromans, M. E. W., van Zijderveld, F. G., & Sweeney, T. (2005). Immunohistochemical Distinction between Preclinical Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie Infection in Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 132(1), 59–69. <https://doi.org/10.1016/J.JCPA.2004.06.004>
- Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R., & Knowles, D. P. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP^{Sc} in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 6310–6315. <https://doi.org/10.1073/pnas.072071199>
- Turu, M., Slevin, M., Ethirajan, P., Luque, A., Elsbali, A., Font, A., Gaffney, J., Cairols, M., Kumar, P., Kumar, S., & Krupinski, J. (2008). The normal cellular prion protein and its possible role in angiogenesis. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13(17), 6491–6500. <https://doi.org/10.2741/3169>
- United States Department of Agriculture. (2022). *National Scrapie Surveillance Plan*. <https://unsplash.com/s/photos/sheep>
- Vafae, T., Walker, F., Thomas, D., Roderjan, J. G., Veiga Lopes, S., da Costa, F. D. A., Desai, A., Rooney, P., Jennings, L. M., Fisher, J., Berry, H. E., & Ingham, E. (2022). Repopulation of decellularised porcine pulmonary valves in the right ventricular outflow tract of sheep: Role of macrophages. *Journal of Tissue Engineering*, 13. <https://doi.org/10.1177/20417314221102680>
- Van Keulen, L. J. M., Vromans, M. E. W., Dolstra, C. H., Bossers, A., & Van Zijderveld, F. G. (2008). Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Archives of Virology*, 153(3), 445–453. <https://doi.org/10.1007/s00705-007-0007-4>

- Van Keulen, L. J. M., Vromans, M. E. W., & Van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, *110*(1), 23–32. <https://doi.org/10.1034/J.1600-0463.2002.100104.X>
- Vernerova, K., Tothova, L., Mikova, A., Vodrazka, P., Simek, B., Hanusova, L., & Citek, J. (2014). BSE-associated polymorphisms in the prion protein gene: An investigation. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, *131*(5), 403–408. <https://doi.org/10.1111/jbg.12090>
- Vetrugno, V. (2004). Safety of milk and milk derivatives in relation to BSE: The lactoferrin example. *BioMetals*, *17*(3), 353–356. <https://doi.org/10.1023/B:BIOM.0000027717.18351.1d>
- Vrentas, C. E., Onstot, S., & Nicholson, E. M. (2012). A comparative analysis of rapid methods for purification and refolding of recombinant bovine prion protein. *Protein Expression and Purification*, *82*(2), 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.02.008>
- Wacinski, P., Gadzinowski, M., Dabrowski, W., Szumilo, J., Wacinski, J., Oru, N., Vicaut, E., Czuczwar, S., Kocki, J., Basinska, T., & Slomkowski, S. (2021). Anti-Inflammatory Effect of Very High Dose Local Vessel Wall Statin Administration: Poly(L,L-Lactide) Biodegradable Microspheres with Simvastatin for Drug Delivery System (DDS). *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(14). <https://doi.org/10.3390/IJMS22147486>
- Wang, F., Wang, X., Abskharon, R., & Ma, J. (2018). Prion infectivity is encoded exclusively within the structure of proteinase K resistant fragments of synthetically generated recombinant PrP^{Sc}. *Acta Neuropathologica Communications*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/s40478-018-0534-0>
- Watts, J. C., Bourkas, M. E. C., & Arshad, H. (2018). The function of the cellular prion protein in health and disease. *Acta Neuropathologica*, *135*(2), 159–178. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1790-y>
- Webb, P. R., Powell, L., Denyer, M., Marsh, S., Weaver, C., Simmons, M. M., Johns, E., Sheehan, J., Horsfield, P., Lyth, C., Wilson, C., Long, A., Cawthraw, S., Saunders, G. C., & Spencer, Y. I. (2009). A Retrospective Immunohistochemical Study Reveals Atypical Scrapie has Existed in the United Kingdom since at Least 1987. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *21*(6), 826–829. <https://doi.org/10.1177/104063870902100609>
- Weissmann, C., & Flechsig, E. (2003). *Weissmann C Flechsig E PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research Br Med Bul 2003*. 1–18. <https://doi.org/10.1093/bmb/dg66.043>
- 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., & Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Veterinary Record*, *142*(5), 103–106. <https://doi.org/10.1136/vr.142.5.103>

- Wells, G. A. H., Scott, A., Johnson, C., Gunning, R., Hancock, R., Jeffrey, M., Dawson, M., & Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Veterinary Record*, *121*(18), 419–420. <https://doi.org/10.1136/vr.121.18.419>
- Wells, G. A. H., Spiropoulos, J., Hawkins, S. A. C., & Ryder, S. J. (2005). Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: Preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Veterinary Record*, *156*(13), 401–407. <https://doi.org/10.1136/vr.156.13.401>
- White, K., Bruckner, J. V., & Guess, W. L. (1973). Toxicological studies of 2-mercaptoethanol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *62*(2), 237–241. <https://doi.org/10.1002/JPS.2600620211>
- Wilesmith, J. W., Ryan, J., Hueston, W., & Hoinville, L. J. (1992). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990. *Veterinary Record*, *130*(5), 90–94. <https://doi.org/10.1136/vr.130.5.90>
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A. H., Ryan, J. B. M., Gavier-Widén, D., & Simmons, M. M. (1997). A cohort study to examine maternally-associated risk factors for bovine spongiform encephalopathy. *Veterinary Record*, *141*(10), 239–243. <https://doi.org/10.1136/vr.141.10.239>
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofmar, A., & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, *347*(9006), 921–925. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)91412-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91412-9)
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of Wildlife Diseases*, *16*(1), 89–98. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.1.89>
- Wrathall, A. E., Brown, K. F. D., Sayers, A. R., Wells, G. A. H., Simmons, M. M., Farrelly, S. S. J., Bellerby, P., Squirrell, J., Spencer, Y. I., Wells, M., Stack, M. J., Bastiman, B., Pullar, D., Scatcherd, J., Heasman, L., Parker, J., Hannam, D. A. R., Helliwell, D. W., Chree, A., & Fraser, H. (2002). Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Veterinary Record*, *150*(12), 365–378. <https://doi.org/10.1136/vr.150.12.365>
- Zhang, Z., Zhang, Y., Wang, F., Wang, X., Xu, Y., Yang, H., Yu, G., Yuan, C., & Ma, J. (2013). De novo generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein. *The FASEB Journal*, *27*(12), 4768. <https://doi.org/10.1096/FJ.13-233965>
- Zhuang, D., Schneider, D. A., Madsen-Bouterse, S. A., Highland, M. A., & Dassanayake, R. P. (2018). Low-volume goat milk transmission of classical scrapie to lambs and goat kids. *PLoS ONE*, *13*(9), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204281>

Zink, R. M. (2021). Considering the use of the terms strain and adaptation in prion research. *Heliyon*, 7(4). <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E06801>

Zlotnik, I., & Rennie, J. C. (1965). Experimental transmission of mouse passaged scrapie to goats, sheep, rats and hamsters. *Journal of Comparative Pathology*, 75(2). [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(65\)90005-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(65)90005-8)

Anexo

Tamaño de muestreo estratificado con *ProMESA*

Muestreo en ovinos:

Ingreso

Nivel de confianza

Error relativo aceptable

Descripción de los estratos
(mínimo requerido: dos estratos)

Estrato	Número de individuos	Esperada prevalencia
1	5870781	0.942
2	8993540	0.942
3		
4		
5		

Resultados

Prevalencia general esperada **0.9420**

Tamaño de muestra **25**

Estrato	n
1	10
2	15
3	0
4	0
5	0

Muestreo en caprinos:

Ingreso

Nivel de confianza

Error relativo aceptable

Descripción de los estratos
(mínimo requerido: dos estratos)

Estrato	Número de individuos	Esperada prevalencia
1	1368344	0.875
2	3495550	0.875
3		
4		
5		

Resultados

Prevalencia general esperada **0.8750**

Tamaño de muestra **56**

Estrato	n
1	16
2	40
3	0
4	0
5	0

Análisis estadístico con *InfoStat*

Diferencias en el número de FL observados entre las muestras rectales

Muestras: tomadas inmediatamente anterior a la unión mucocutánea (muestra A) y aquellas tomadas a 2 cm de la unión (muestra B)

Prueba de Kruskal Wallis

Variable	Tipo de muestra	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
Número de FL A		35	9,31	9,23	6,00	43,73	11,44	0,0007
Número de FL B		35	4,83	7,20	2,00	27,27		

Diferencias en la aptitud diagnóstica entre las muestras rectales

Muestras: tomadas inmediatamente anterior a la unión mucocutánea (muestra A) y aquellas tomadas a 2 cm de la unión (muestra B)

Tablas de contingencia

Frecuencias absolutas

En columnas: Tipo de muestra

Aptitud diagnóstica	A	B	Total
Apto	23	6	29
No apto	12	29	41
Total	35	35	70

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	17,01	1	<0,0001
Chi Cuadrado MV-G2	17,90	1	<0,0001
Irwin-Fisher bilateral	0,50		<0,0001
Coef.Conting.Cramer	0,35		
Kappa (Cohen)	0,49		
Coef.Conting.Pearson	0,44		
Coefficiente Phi	0,49		

Diferencias en la aptitud diagnóstica de tercer párpado completo observada entre el grupo J y el grupo G

Animales menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses.

Tablas de contingencia

Frecuencias absolutas

En columnas: Grupo etario

Aptitud diagnóstica	3P	G	J	Total
Apto	4	7	11	
No apto	26	29	55	
Total	30	36	66	

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	0,44	1	0,5071
Chi Cuadrado MV-G2	0,45	1	0,5042
Irwin-Fisher bilateral	-0,11		0,5332
Coef.Conting.Cramer	0,06		
Kappa (Cohen)	-0,06		
Coef.Conting.Pearson	0,08		
Coficiente Phi	-0,08		

Cocientes de chance (odds ratio)

Estadístico	Estim	LI 95%	LS 95%
Odds Ratio 1/2	0,64	0,18	2,29
Odds Ratio 2/1	1,57	0,44	5,65

Diferencias en la aptitud diagnóstica de mucosa rectal observada entre el grupo J y el grupo G

Animales menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses.

Tablas de contingencia

Frecuencias absolutas

En columnas: Grupo etario

Aptitud diagnóstica	MR	G	J	Total
Apto	14	12		26
No apto	16	24		40
Total	30	36		66

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1,22	1	0,2697
Chi Cuadrado MV-G2	1,22	1	0,2696
Irwin-Fisher bilateral	0,14		0,3176
Coef.Conting.Cramer	0,10		
Kappa (Cohen)	0,13		
Coef.Conting.Pearson	0,13		
Coeficiente Phi	0,14		

Cocientes de chance (odds ratio)

Estadístico	Estim	LI 95%	LS 95%
Odds Ratio 1/2	1,75	0,66	4,67
Odds Ratio 2/1	0,57	0,21	1,52

Diferencias en la aptitud diagnóstica de mucosa de tercer párpado observada entre el grupo J y el grupo G

Animales menores (grupo J) y mayores (grupo G) a 18 meses.

Tablas de contingencia

Frecuencias absolutas

En columnas:Grupo etario

Aptitud diagnóstica	M3P	G	J	Total
Apto	1	0	1	1
No apto	29	36	65	
Total	30	36	66	

Estadístico	Valor	gl	p
Chi Cuadrado Pearson	1,22	1	0,2697
Chi Cuadrado MV-G2	1,60	1	0,2066
Irwin-Fisher bilateral	0,55		0,4545
Coef.Conting.Cramer	0,10		
Kappa (Cohen)	0,04		
Coef.Conting.Pearson	0,13		
Coeficiente Phi	0,14		

Cocientes de chance (odds ratio)

Estadístico	Estim	LI 95%	LS 95%
Odds Ratio	1/2	sd	sd

Diferencias en marcación de CD21 en TL de tercer párpado entre el grupo J y el grupo G

Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Cálculo exacto de probabilidades

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)	
Grupo etario	CD21	3P	A	B	7	4	1,10	1,97	0,65	0,84	32,50	0,1273

A: ovinos menores de 18 meses

B: ovinos mayores de 18 meses

Diferencias en marcación de CD21 entre el TL de la mucosa rectal y del tercer párpado

Prueba de Wilcoxon para muestras independientes

Clasific	Variable	Grupo 1	Grupo 2	n(1)	n(2)	Media(1)	Media(2)	DE(1)	DE(2)	W	p(2 colas)	
Muestra	CD21	3P	MR		11	26	1,41	2,33	0,81	0,68	116,50	0,0020

3P: tercer párpado

MR: mucosa rectal

Secuenciaciones en formato FASTA

Secuenciación del producto de PCR amplificado de un ovino y clonado en pGEM-T

>B2F-T7promotor.

```
CTCGAGGCTGACACCCTCTTATTTTGCAGAGAAGTCATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCTGGT
TCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAACCTGGCGGAGGATGGAACACTG
GGGGGAGCCGATACCCGGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAACCGCTATCCACCTCAGGGAGGGGGTGGCTGGGG
TCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAACCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGAC
AGCCACATGGTGGTGGAGGCTGGGGTCAAGGTGGTAGCCACAGTCAGTGAACAAGCCCAGTAAGCCAAGAACC
AACATGAAGCATGTGGCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGAA
GTGCCATGAGCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATGTACCGTTA
CCCCAACCAAGTGTACTACAGACCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCAACATC
ACAGTCAAGCAACACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGGAGAAGTTCACCGAAACTGACATCAAGATAATGGAG
CGAGTGGTGGAGCAAATGTGCATCACCCAGTACCAGAGAGAATCCCAGGCTTATTACCAAAGGGGGGCAAGTGT
GATCCTCTTTTCTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTCTCATTCTTCTCATAGTAGGATAGGGGCAACCTCC
TGTTTTCATTATCTTCTTAATCTTTGCCAGGTTAAAAGCT
```

Resultados en BLAST: *Ovis aries* prion protein gene

Secuenciación del producto de PCR amplificado de un bovino y clonado en pGEM-T

>3-T7

```
CTCGAGGCTGACACCCTCTTATTTTGCAGATAAGTCATCATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGTTGGATCCT
GGTTCTCTTTGTGGCCATGTGGAGTGACGTGGGCCTCTGCAAGAAGCGACCAAACCTGGAGGAGGAT
GGAACACTGGGGGGAGCCGATACCCAGGACAGGGCAGTCCTGGAGGCAACCGTTATCCACCTCAGGG
AGGGGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGAGGTGGCTGGGGCCAGCCTCATGGAGGTGGCTGGGGCCAG
CCTCATGGAGGTGGCTGGGGTCAGCCCCATGGTGGTGGCTGGGGACAGCCACATGGTGGTGGAGGCT
GGGGTCAAGGTGGTACCCACGGTCAATGGAACAAACCCAGTAAGCCAAAAACCAACATGAAGCATGTG
GCAGGAGCTGCTGCAGCTGGAGCAGTGGTAGGGGGCCTTGGTGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATGA
GCAGGCCTCTTATACATTTTGGCAATGACTATGAGGACCGTTACTATCGTGAAAACATGCACCGTTACCC
CAACCAAGTGTACTACAGGCCAGTGGATCAGTATAGTAACCAGAACAACCTTTGTGCATGACTGTGTCAA
CATCACAGTCAAGGAACACACAGTCACCACCACCACCAAGGGGGGAGAAGTTCACCGAAACTGACATCAA
GATGATGGAGCGAGTGGTGGAGCAAATGTGCATTACCCAGTACCAGAGAGAAATCCCAGGCTTATTAC
CAACGAGGGGCAAGTGTGATCCTCTTCTCCCTCCTGTGATCCTCCTCATCTCTTCTCATTCTTCTCA
TAGTAGGATAGGGGCAACCTTCTGTTTTCATTATCTTCTTAATCTTTGCCAGGTTAA
```

Resultados en BLAST: *Bos taurus* prion protein (PRNP)

Datos de ovinos y caprinos

Animal N°	Especie	Grupo Etario	FL 3P	Aptitud 3P	FL B3P	Aptitud B3P	FL MR	Aptitud MR
INTA-01	Caprino	J	6	Apto	0	No apto	8	Apto
INTA-02	Caprino	J	6	Apto			20	Apto
INTA-03	Caprino	J	7	Apto	6	Apto	6	Apto
INTA-04	Caprino	J	8	Apto	0	No apto	10	Apto
INTA-05	Caprino	J	9	Apto			10	Apto
INTA-06	Caprino	J	5	No apto	0	No apto	20	Apto
INTA-07	Caprino	J	4	No apto	1	No apto	45	Apto
INTA-08	Caprino	J	10	Apto	3	No apto	15	Apto
INTA-09	Caprino	J	14	Apto	4	No apto	13	Apto
INTA-10	Caprino	J	4	No apto			20	Apto
INTA-11	Caprino	J	6	Apto			0	No apto
INTA-12	Caprino	J	6	Apto	0	No apto	6	Apto
INTA-13	Caprino	J	0	No apto	3	No apto	4	No apto
INTA-14	Caprino	J	0	No apto			6	Apto
INTA-15	Caprino	J	2	No apto	4	No apto	6	Apto
INTA-16	Caprino	J	1	No apto			2	No apto
19	Caprino	G	8	Apto	2	No apto	9	Apto
20	Caprino	J	3	No apto	0	No apto	5	No apto
23	Caprino	J	9	Apto			10	Apto
24	Caprino	J	11	Apto	3	No apto	0	No apto
24c	Caprino	J	0	No apto	1	No apto	9	Apto
25c	Caprino	J	5	No apto			13	Apto
26	Caprino	J	7	Apto	1	No apto	0	No apto
26c	Caprino	J	6	Apto	0	No apto	9	Apto
27	Caprino	J	8	Apto			0	No apto
28	Caprino	J	6	Apto			0	No apto
29	Caprino	J	6	Apto	2	No apto	0	No apto
29c	Caprino	J	0	No apto			0	No apto
31	Caprino	G	13	Apto	0	No apto	3	No apto
31c	Caprino	J	2	No apto	3	No apto	7	Apto
32	Caprino	J	13	Apto	8	Apto	18	Apto
32c	Caprino	J	0	No apto			8	Apto
33	Caprino	J	7	Apto	3	No apto	6	Apto
33c	Caprino	J	2	No apto	1	No apto	8	Apto
34	Caprino	J	8	Apto	2	No apto	6	Apto
35	Caprino	J	9	Apto	0	No apto	10	Apto
35c	Caprino	J	2	No apto			20	Apto
36	Caprino	J	17	Apto	5	No apto	7	Apto
36c	Caprino	J	1	No apto			4	No apto

38	Caprino	J	5	No apto	0	No apto	6	Apto
39	Caprino	J	1	No apto	4	No apto	1	No apto
39c	Caprino	J	0	No apto	2	No apto	26	Apto
40	Caprino	J	0	No apto	1	No apto	3	No apto
40c	Caprino	J	0	No apto	0	No apto	0	No apto
41	Caprino	J	15	Apto	0	No apto	1	No apto
41c	Caprino	J	0	No apto			37	Apto
42	Caprino	J	3	No apto	2	No apto	12	Apto
43	Caprino	J	7	Apto			1	No apto
43c	Caprino	J	2	No apto	0	No apto	5	No apto
44	Caprino	G	5	No apto	0	No apto	3	No apto
44c	Caprino	J	0	No apto			20	Apto
45	Caprino	J	6	Apto	5	No apto	1	No apto
46	Caprino	J	6	Apto	1	No apto	1	No apto
46c	Caprino	J	1	No apto	2	No apto	34	Apto
Ov9	Ovino	G	2	No apto	0	No apto	4	No apto
Ov10	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov11	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	7	Apto
Ov20	Ovino	J	1	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov21	Ovino	J	4	No apto			0	No apto
Ov22	Ovino	J	15	Apto	2	No apto	0	No apto
Ov23	Ovino	J	3	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov24	Ovino	J	2	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov25	Ovino	J	4	No apto			8	Apto
Ov26	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	4	No apto
Ov27	Ovino	J	2	No apto	0	No apto	2	No apto
Ov28	Ovino	G	5	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov29	Ovino	J	4	No apto			0	No apto
Ov30	Ovino	J	7	Apto			0	No apto
Ov31	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	1	No apto
Ov32	Ovino	J	3	No apto	0	No apto	1	No apto
Ov33	Ovino	J	1	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov34	Ovino	J	3	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov35	Ovino	G	1	No apto			0	No apto
Ov36	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov37	Ovino	J	6	Apto	0	No apto	5	No apto
Ov38	Ovino	G	3	No apto	0	No apto	4	No apto
Ov39	Ovino	J	4	No apto			0	No apto
Ov40	Ovino	J	2	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov41	Ovino	G	3	No apto	0	No apto	11	Apto
Ov42	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	1	No apto

Ov43	Ovino	J	2	No apto	4	No apto	0	No apto
Ov44	Ovino	J	2	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov45	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov46	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov47	Ovino	J	6	Apto			3	No apto
Ov50	Ovino	J	1	No apto	2	No apto	4	No apto
Ov51	Ovino	J	0	No apto	1	No apto	38	Apto
Ov52	Ovino	G	6	Apto	2	No apto	6	Apto
Ov53	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	1	No apto
Ov54	Ovino	G	6	Apto	1	No apto	6	Apto
Ov55	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	4	No apto
Ov56	Ovino	J	1	No apto	0	No apto	15	Apto
Ov57	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	0	No apto
Ov58	Ovino	G	9	Apto	6	Apto	14	Apto
Ov59	Ovino	G	1	No apto	0	No apto	6	Apto
Ov60	Ovino	G	0	No apto	0	No apto	8	Apto
Ov61	Ovino	J	2	No apto	0	No apto	20	Apto
Ov62	Ovino	G	6	Apto	1	No apto	6	Apto
Ov63	Ovino	G	2	No apto	0	No apto	1	No apto
Ov64	Ovino	J	6	Apto	1	No apto	1	No apto
Ov65	Ovino	G	1	No apto	2	No apto	7	Apto
Ov66	Ovino	G	0	No apto	1	No apto	6	Apto
Ov67	Ovino	J	2	No apto	0	No apto	6	Apto
Ov68	Ovino	G	1	No apto	0	No apto	7	Apto
Ov69	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	9	Apto
Ov70	Ovino	J	0	No apto	1	No apto	39	Apto
Ov71	Ovino	G	1	No apto	1	No apto	4	No apto
Ov72	Ovino	G	3	No apto	1	No apto	11	Apto
Ov73	Ovino	G	0	No apto	2	No apto	1	No apto
Ov74	Ovino	G	0	No apto	2	No apto	10	Apto
Ov75	Ovino	J	17	Apto	1	No apto	6	Apto
Ov76	Ovino	J	8	Apto	2	No apto	4	No apto
Ov78	Ovino	G	0	No apto			18	Apto
Ov79	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	22	Apto
Ov80	Ovino	G	2	No apto	1	No apto	6	Apto
Ov81	Ovino	J	2	No apto	4	No apto	17	Apto
Ov82	Ovino	J	0	No apto			4	No apto
Ov83	Ovino	J	0	No apto	0	No apto	14	Apto
Ov84	Ovino	G	3	No apto	0	No apto	4	No apto
Ov85	Ovino	G	1	No apto	1	No apto	1	No apto

FL 3P: Número de folículos linfoides en tercer párpado completo

FL B3P: Número de folículos linfoides en muestras conjuntivales de tercer párpado completo

FL MR: Número de folículos linfoides en mucosa rectal

Datos de la marcación de CD21 en las muestras de tercer párpado de ovinos analizadas

Animal N°	Especie	Grupo Etario	Prom CD21
Ov22	Ovino	A	1,2
Ov30	Ovino	A	0,8
Ov37	Ovino	A	2
Ov47	Ovino	A	0,8
Ov52	Ovino	B	2,33
Ov54	Ovino	B	0,8
Ov58	Ovino	B	2,75
Ov62	Ovino	B	2
Ov64	Ovino	A	0
Ov75	Ovino	A	1,2
Ov76	Ovino	A	1,67

A: menores a 18 meses

B: mayores a 18 meses

Datos de la marcación de CD21 en las muestras de mucosa rectal de ovinos analizadas

Animal N°	Especie	Grupo Etario	Prom CD21
Ov11	Ovino	A	2,67
Ov25	Ovino	A	2,67
Ov41	Ovino	B	2,33
Ov51	Ovino	A	3
Ov52	Ovino	B	2,8
Ov54	Ovino	B	1,4
Ov56	Ovino	A	2,5
Ov58	Ovino	B	2,17
Ov59	Ovino	B	2,33
Ov60	Ovino	B	2
Ov61	Ovino	A	2,83
Ov62	Ovino	B	2,2
Ov65	Ovino	B	3
Ov66	Ovino	B	2
Ov67	Ovino	A	1,6

Ov68	Ovino	B	2,33
Ov69	Ovino	A	3,33
Ov70	Ovino	A	2,83
Ov72	Ovino	B	2,4
Ov74	Ovino	B	2,83
Ov75	Ovino	A	2,8
Ov78	Ovino	B	1,2
Ov79	Ovino	A	2,67
Ov80	Ovino	B	0,25
Ov81	Ovino	A	2,83
Ov83	Ovino	A	1,5

A: menores a 18 meses

B: mayores a 18 meses