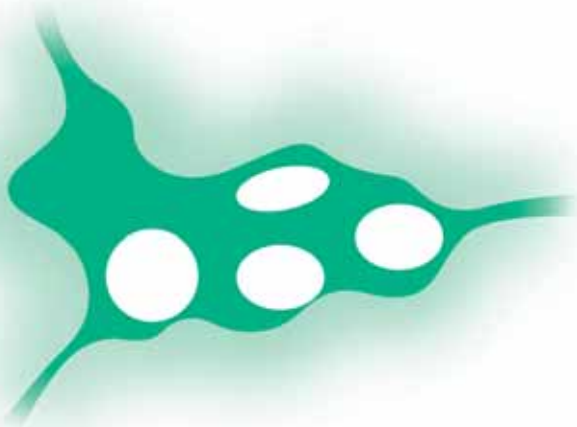


17

QUADERNS DE SALUT PÚBLICA

**Guia  
per a la prevenció  
i el control de  
les encefalopaties  
espongiformes  
transmissibles**



Generalitat de Catalunya  
**Departament de Sanitat  
i Seguretat Social**

Biblioteca de Catalunya. Dades CIP:

---

**Guia** per a la prevenció i el control de les encefalopaties  
espongiformes transmissibles. – (Quaderns de salut pública ; 17)  
Bibliografia  
ISBN 84-393-5706-0  
I. Ferrer, Isidro, dir. II. Pumarola Batlle, Martí, dir. III. Catalunya.  
Departament de Sanitat i Seguretat Social IV. Col·lecció:  
Quaderns de salut pública ; 17  
1. Malalties prioniques - Catalunya - Prevenció 2. Malalties  
prioniques - Catalunya  
616.831-084

---

© Generalitat de Catalunya  
Departament de Sanitat i Seguretat Social

Edita: Direcció General de Salut Pública  
1a. edició: Barcelona, gener de 2002  
Tiratge: 5.000 exemplars  
ISBN: 84-393-5706-0  
Dipòsit legal: B-12.913-2002

Coordinació editorial: Direcció General de Salut Pública  
Correcció lingüística: Secció de Normalització Lingüística  
Disseny original: Ideograma, S.A.  
Adaptació de la coberta i maquetació: AJM Serveis Editorials, SCCL  
Impressió: Press Line, S.L.

## **Direcció**

Isidre Ferrer  
Martí Pumarola

## **Coordinació**

Àngela Domínguez  
Carlos Nos

## **Autors**

Agustí Codina  
Montserrat Cortada  
Àngela Domínguez  
Isidre Ferrer  
Josep Gàmez  
Eduard Mata  
Carlos Nos  
Lluís Picart  
Martí Pumarola  
Albert Saiz  
Jordi Yagüe

## **Col·laboradors**

Glòria Cugat  
Sílvia Sisó  
Àngel Teixidó  
Enric Vidal

## Llista d'abreviacions

CA	Comunitats autònomes
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
EEF	Encefalopatia espongiforme felina
EEG	Electroencefalograma
EET	Encefalopaties espongiformes transmissibles
ERG	Electroretinograma
FAS	Fibril·les associades a la tremolor ovina ( <i>scrapie</i> )
GABA	Àcid gammaaminobutíric
ILF	Insomni letal familiar
LCR	Líquid cefaloraquidi
M	Metionina
MCJ	Malaltia de Creutzfeldt-Jakob
MER	Materials específics de risc
MGSS	Malaltia de Gerstmann-Straüssler-Scheinker
MSC	Ministeri de Sanitat i Consum
nNOS	Sintasa d'òxid nítric neuronal
<i>PRNP</i>	Gen que codifica la PrP
PrP	Proteïna prionica
PrP <sup>C</sup>	Isoforma cel·lular de la proteïna prionica
PrP <sup>CJD</sup>	Isoforma patogènica de la proteïna prionica
PrP <sup>Sc</sup>	Isoforma patogènica de la proteïna prionica
RM	Ressonància magnètica
SNC	Sistema nerviós central
V	Valina
vMCJ	Variante de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob

# Índex

<b>Presentació</b>	<b>9</b>
<b>1. Els prions. Concepte i característiques</b>	<b>11</b>
<b>2. Descripció clínica i patològica de les EET</b>	<b>23</b>
2.1. Descripció clínica i patològica de les EET en els animals	23
2.1.1. Introducció	23
2.1.2. Quadre clínic	24
2.1.3. Quadre lesional	26
2.2. Descripció clínica i patològica de les EET en els humans	29
2.2.1. Malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica	29
2.2.2. <i>Kuru</i>	35
2.2.3. Malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica	36
2.2.4. Variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob	37
2.2.5. EET familiars	38
<b>3. Diagnòstic de les EET</b>	<b>43</b>
3.1. Diagnòstic de les EET en els animals	43
3.1.1. Diagnòstic preclínic	43
3.1.2. Diagnòstic clínic	43
3.1.3. Diagnòstic histopatològic	43
3.2. Diagnòstic de les EET en els humans	45
3.2.1. Proves complementàries	48
<b>4. Epizootiologia i epidemiologia de les EET</b>	<b>57</b>
4.1. Epizootiologia de les EET en els animals	57
4.1.1. Epizootiologia descriptiva de les EET en els animals	57
4.1.2. Mecanismes de transmissió i susceptibilitat de l'hoste	74
4.2. Epidemiologia de les EET en els humans	78
4.2.1. Epidemiologia descriptiva de les EET en els humans	78
4.2.2. Mecanismes de transmissió i susceptibilitat de l'hoste	88
<b>5. La prevenció de les EET en els humans</b>	<b>91</b>
5.1. En els centres sanitaris	91
5.1.1. Contacte personal i clínic rutinari	91
5.1.2. Procediments d'alt risc	92

5.1.3. Situacions específiques	92
5.1.4. Mesures per minimitzar el risc derivat de l'ús de material humà	94
5.1.5. Estudi <i>post mortem</i> de pacients amb sospita d'EET	94
5.1.6. Procediments de descontaminació i tractament dels residus	97
5.2. En la cadena alimentària	102
5.2.1. Eliminació dels materials específics de risc	104
5.2.2. Anàlisi per a la investigació de l'agent causal de l'EEB en els animals sacrificats als escorxadors	115
5.2.3. Actuacions a Catalunya	124
5.3. Vigilància de les EET en els humans	127
5.3.1. Vigilància de les EET en els humans a Catalunya	129
<b>6. Bibliografia</b>	<b>133</b>
<b>7. Legislació</b>	<b>155</b>

## Índex de taules i figures

### Taules

1. EET en els animals	12
2. EET en els humans	12
3. Quadre clínic de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica	31
4. Variants de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica	35
5. Mutacions més freqüents en les EET familiars	39
6. Causes de falsos positius en el test de la proteïna 14-3-3	49
7. Valor diagnòstic comparatiu de l'EEG i el test de la 14-3-3 en l'MCJ esporàdica	50
8. Criteris d'EEG característic	53
9. Causes de falsos positius a l'EEG	53
10. Genotips del gen PrP d'ovelles Cheviot i Suffolk i susceptibilitat a la tremolor ovina	59
11. Anys d'aparició dels primers casos autòctons d'EEB en diversos països europeus	62
12. Distribució per anys del nombre de casos d'EEB en països europeus	63
13. Pes relatiu dels animals adults (>24 mesos) en la cabana bovina de les CA	71
14. Nombre de tests positius i ràtio per cada 100.000 bovins adults (>24 mesos) per CA	72
15. Relació de tests positius en relació amb la població bovina adulta (>24 mesos) i cada una de les subpoblacions per països de la UE	73
16. Incidència de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob en diferents països	81
17. Casos de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica	84
18. Persones que poden originar una contaminació	89
19. Desinfectants químics no efectius enfront dels agents de les EET	98
20. Règims d'autoclau recomanats actualment (prebuit)	100
21. Càrrega infectiva en teixits d'un animal boví afectat	104
22. Mesures de protecció contra les encefalopaties espongiformes transmissibles (període juliol 1996/setembre 2000)	106
23. Mesures de protecció contra les encefalopaties espongiformes transmissibles (període octubre 2000/juny 2001)	107

24. Mesures de protecció contra les encefalopaties espongiformes transmissibles (a partir de l'1 de juliol de 2001)	108
25. Sistemes de destrucció dels MER	112
26. Nombre de bovins als quals s'ha retirat MER a Catalunya	113
27. Mostres analitzades en el període 1996-2000	126
28. Mostres analitzades en el primer semestre de 2001	127
29. Mortalitat per EET humanes a Catalunya (període 1993-juliol 1997)	130
30. Mortalitat per EET humanes a Catalunya (període 1993-novembre 2001)	130

## Figures

1. Esquema dels diferents patrons de PrP analitzats mitjançant transferència Western després de digestió amb proteïnasa K	18
2. Neurona amb vacúols i neuròpil amb dipòsit de PrP en vaca afectada per l'EEB (tècnica d'immunohistoquímica després de digestió amb proteïnasa K)	27
3. Secció de còrtex cerebral d'un pacient amb malaltia de Creutzfeldt-Jakob (tinció d'hematoxilina-eosina)	32
4. Dipòsit massiu de PrP <sup>Sc</sup> en la capa granular (patró sinàptic)	33
5. Transferència Western de cervell incubat amb proteïnasa K corresponent al segon cas d'EEB diagnosticat a Catalunya	45
6. Immunotransferència de líquid cefaloraquídi que ha sofert immunoreacció amb un anticòs antiproteïna 14-3-3	49
7. EEG en l'MCJ	51
8. Complexos periòdics característics en l'electroencefalograma	52
9. RM cranial en l'MCJ	54
10. Distribució de casos d'EEB a Espanya. Juliol de 2001	64
11. Evolució de l'epizoòtia d'EEB al Regne Unit	65
12. Evolució de l'epizoòtia d'EEB a la resta de la Unió Europea	66
13. Distribució dels animals positius per any de naixement	75
14. MCJ esporàdica: mortalitat específica per edat	83
15. Evolució de les EET humanes a Catalunya (casos confirmats i probables)	88
16. Zona del tronc de l'encèfal d'elecció (òbex) per a la realització del test ràpid	121
17. Vacúols en el pericarió de dues neurones en una vaca afectada per l'EEB	123
18. Àrees representatives en malalties prioniques	124
19. Talls seriats de tot l'encèfal d'una ovella	125



## Presentació

L'anunci, l'any 1996, de la vinculació entre la nova variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob i l'epizoòtia d'encefalopatia espongiforme bovina (EEB) a la Gran Bretanya, va suposar, al marge de les seves repercussions sobre la salut pública, una veritable crisi de credibilitat i de confiança en les institucions a tota la Unió Europea. Aquest fenomen s'ha reproduït recentment, al nostre país, amb l'aparició dels primers casos d'aquesta malaltia animal a l'Estat espanyol.

Aquestes crisis, a més de les repercussions econòmiques i socials molt importants, han comportat un replantejament conceptual de la seguretat alimentària. La conclusió més significativa és que Europa compta amb un bon marc legislatiu i de control oficial en l'àmbit del control sanitari dels aliments i que s'ha de construir un marc semblant per al control del sector primari agrícola i ramader, inspirat i presidit per la voluntat de protecció de la salut de la població. En aquest sentit, no s'ha d'oblidar que la crisi de les «vaques boges» té el seu origen en l'alimentació animal i en la indústria de reaprofitament de subproductes, no en la indústria alimentària. El *Llibre blanc sobre seguretat alimentària*, publicat per la Comissió Europea el gener de 2001, explica que per garantir la salubritat dels aliments s'han d'aplicar mesures preventives al llarg de tota la cadena alimentària, des de les explotacions agrícoles i ramaderes fins a la taula dels consumidors, amb un objectiu central preeminent: la protecció de la salut de les persones.

A més, a nivell administratiu s'estan produint, arreu del món, adaptacions i reformes de les organitzacions responsables de la seguretat alimentària per fer front als nous reptes i dotar-les de la capacitat per liderar l'aplicació i consolidació dels nous principis, sobretot la gestió de la transversalitat. A Catalunya, l'Avantprojecte de Llei de seguretat alimentària, aprovat recentment pel Govern, preveu la creació de l'Agència Catalana de Seguretat Alimentària, adscrita al Departament de Sanitat i Seguretat Social, amb aquesta missió.

El problema sanitari de les encefalopaties espongiformes transmissibles es pot considerar, en aquest sentit, com a paradigmàtic ja que és impossible abordar-lo sense una perspectiva intersectorial i interdisciplinària. Per minimitzar-ne els efectes sobre la salut de la població cal continuar treballant en diversos àmbits. En efecte, el coneixement de la naturalesa dels prions i de les malalties que ocasionen, tant a les persones com als animals, dels mecanismes de transmissió i de la susceptibilitat dels individus, constitueix la base per a la implementació de les mesures preventives que s'han d'aplicar perquè les persones no emmalalteixin.

Tres anys després de la publicació de *Prevençió i control de les encefalopaties espongiformes transmissibles als centres sanitaris*, el Departament de Sanitat i Seguretat Social ha considerat oportú elaborar una nova monografia sobre aquesta qüestió.

Aquesta guia pretén ser, en el context actual, una eina de treball útil per a totes les persones relacionades professionalment amb aquestes malalties en diversos àmbits com la medicina, la veterinària, els laboratoris de diagnòstic i diverses disciplines de la salut pública (epidemiologia, seguretat alimentària, etc.). Per això s'ha comptat amb la col·laboració professional d'investigadors de reconegut prestigi en el món acadèmic i sanitari i de professionals vinculats a les accions operatives de control i prevenció.

Però, a més, les polítiques de salut pública que abordin riscos sanitaris com aquests s'han de construir i desenvolupar en un marc conceptual caracteritzat pel respecte als principis de precaució i de transparència. Això significa que hem de ser capaços de generar en els ciutadans el convenciment que les decisions que s'adopten en matèria de salut pública s'inspiren en evidències científiques, que no tenen altra motivació que garantir la seva salut, que es prenen amb una sistemàtica que en permet el coneixement per l'opinió pública i que es decideixen en àmbits administratius vinculats amb la salut pública i la protecció de la salut dels ciutadans. La nostra voluntat és que aquesta guia s'inscriuï en aquest marc. Espero i desitjo que aquesta guia sigui d'utilitat per al control de les malalties ocasionades per prions al nostre país i que, a més, contribueixi a la construcció d'un entorn que permeti la recuperació de la confiança dels ciutadans de Catalunya, millorant la seva percepció sobre els dispositius encarregats de protegir-ne la salut.

**Lluís Salleras Sanmartí**

Director general de Salut Pública

# 1. Els prions. Concepte i característiques

## Introducció

Els prions es generen per un canvi en la conformació de la proteïna priònica o PrP. La isoforma cel·lular de la PrP (PrP<sup>C</sup>) és una proteïna de membrana, component fisiològic de les cèl·lules nervioses. Les prionopaties són un grup de malalties en les quals la PrP<sup>C</sup> es transforma en una isoforma que és patològica, anomenada PrP<sup>Sc</sup> (o PrP<sup>CJD</sup>)<sup>1-12</sup>.

La PrP<sup>Sc</sup> és danyina per a les membranes neuronals i produeix la seva destrucció, que es manifesta inicialment com microvacuolització de les cèl·lules nervioses i del neuròpil i progressa cap a la mort neuronal. Aquesta microvacuolització de l'encèfal determina el nom d'encefalopatia espongiforme. La PrP<sup>Sc</sup> té unes propietats úniques com ara la seva resistència als agents físics i químics, inclosa la resistència a proteases, i té la capacitat de produir canvis de conformació en la PrP<sup>C</sup> que afavoreixen el progrés de la malaltia i la transmissió d'un animal a un altre amb un període d'incubació llarg.

Per tant, les malalties priòniques són encefalopaties espongiformes transmissibles (EET) amb una expressió molt variable que depèn de la soca de proteïna PrP<sup>Sc</sup>, de les característiques de la PrP<sup>C</sup> del receptor, de la via de transmissió i de l'anomenada càrrega priònica o quantitat de proteïna amb capacitat contagiante.

Les principals EET naturals són la tremolor ovina (*scrapie*) en les ovelles i cabres, i el *kuru*, la malaltia de Creutzfeldt-Jakob, l'insomni letal familiar i la malaltia de Gerstmann-Straüssler-Scheinker en l'ésser humà (taules 1 i 2).

El *kuru* és una malaltia lligada al canibalisme ritual de tribus de Nova Guinea. La transmissió de la malaltia es produïa per via alimentària. La desaparició del canibalisme ha convertit el *kuru* en una entitat residual.

La malaltia de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), a la vegada, pot ser: a) una malaltia esporàdica, fet que ocorre en més del noranta per cent dels casos, l'origen de la qual és desconegut però no existeix evidència de transmissió per via alimentària; b) una malaltia iatrogènica, secundària a implantació de duramàter, còrnia o extractes hipofítics utilitzats per al tractament amb hormona de creixement, i c) una malaltia hereditària, produïda per mutacions en el gen que codifica la PrP, que en l'ésser humà s'anomena *PRNP* i es troba en el cromosoma 20.

L'insomni letal familiar (ILF) és una malaltia priònica hereditària associada a una mutació del codó 178 del gen *PRNP* acompanyada en el mateix

Taula 1. EET en els animals

Nom de la malaltia	Espècie afectada	Any del diagnòstic
Tremolor ovina o <i>scrapie</i>	Ovella, cabra	1732
Encefalopatia transmissible del visó	Visó	1947
Malaltia caquèctica crònica	Cérvol mula, ant	1980
Encefalopatia espongiforme bovina	Bovins	1986
Encefalopatia espongiforme	Ant, niala, òrix, cudú gran	1986-1989
Encefalopatia espongiforme felina	Gat	1990
Encefalopatia espongiforme	Puma, guepard, ocelot	1992
Encefalopatia espongiforme dels primats	Simi rhesus ( <i>Macacca mulatta</i> )	1996

Taula 2. EET en els humans

Malaltia	Etiologia
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica	Mutació en el gen <i>PRNP</i> somàtica o conversió espontània de PrP <sup>C</sup> a PrP <sup>CJD</sup> ?
<i>Kuru</i>	Ingestió de prions humans durant rituals de canibalisme
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica	Inoculació accidental de prions humans
Variante de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob	Ingestió de soques de prions d'EEB
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob familiar	Mutacions puntuals o insercions en el gen <i>PRNP</i> germinals
Malaltia de Gerstmann-Straüssler-Scheinker	Mutacions puntuals o insercions en el gen <i>PRNP</i> germinals
Insomni letal familiar	Mutacions puntuals en el gen <i>PRNP</i> germinals

al·lel per una metionina (M) en el codó 129. Aquest aspecte és interessant, ja que la mateixa mutació en el codó 178 del mateix gen, però amb valina (V) en el codó 129, dona lloc a un quadre d'MCJ familiar molt semblant al que es manifesta en les formes esporàdiques d'MCJ. La malaltia de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (MGSS) inclou, en sentit estricte, formes familiars genèticament determinades de prionopatia, lligades a mutacions en el codó 102 del gen *PRNP*. No obstant això, aquest terme s'ha utilitzat per designar altres formes hereditàries de malaltia prionica. La tremolor ovina ha estat una malaltia restringida a ovelles i cabres, sense capacitat aparent de dany a altres espècies animals i a l'ésser humà. Malgrat això, la utilització en el Regne Unit de canals d'ovelles malaltes transformades en farines càrnies en unes condicions que no destrueixen la proteïna prionica anormal PrP<sup>Sc</sup> va provocar la transmissió de la tremolor ovina al bestiar boví i l'aparició d'una nova malaltia al 1985 que es

coneix com a encefalopatia espongiforme bovina (EEB) o malaltia de les vaques boges. La prohibició tardana de les condicions insegures de fabricació de farines i de la seva comercialització, juntament amb el lliure mercat de carn i farines i, molt particularment, el frau, han contribuït a fer que la malaltia s'hagi estès a la majoria de països europeus.

Com a conseqüència de l'EEB i associades a ella, hi ha altres prionopaties que han afectat altres animals i l'ésser humà. L'anomenada nova variant d'MCJ, variant britànica d'MCJ o simplement variant de l'MCJ (vMCJ), es va descriure per primera vegada al Regne Unit deu anys més tard de la identificació de l'EEB. Altres formes noves de malaltia prionica en els animals són l'encefalopatia espongiforme dels gats (encefalopatia espongiforme felina), i encefalopaties espongiformes d'altres felins i de remugants en parcs i zoològics. En tots aquests casos i en l'encefalopatia espongiforme del visó, la forma de transmissió més plausible de la malaltia és la via alimentària.

Una EET rara en animals l'origen de la qual no queda ben establert és la malaltia caquètica crònica de cérvols i rens, circumscrita a petites zones rurals del nord dels Estats Units d'Amèrica.

### Alteracions generals en les EET

Les alteracions en el sistema nerviós central (SNC) en les EET consisteixen en pèrdua neuronal, microspongiosi confluent en el neuròpil i vacuolització neuronal, astrocitosi i dipòsits de PrP anormal. Aquestes alteracions són variables en les EET humanes i animals, i també entre les diferents formes de prionopaties humanes<sup>3,13-19</sup>. L'activació microglial i d'astròcits és variable segons l'espècie. El dany oligodendroglial, encara que present, és més limitat<sup>20</sup>.

Estudis amb microscòpia electrònica en malalties prioniques humanes, animals i experimentals han mostrat dilatacions del reticle endoplàsmic, i vacuolitzacions dendrítiques i sinàptiques amb acumulació de restes membranoses laxes<sup>14,21-23</sup>. També hi ha alteracions dendrítiques discretes immunoreactives per a ubiquitina<sup>24-25</sup>. Les alteracions de l'arborització dendrítica també són visibles amb el mètode de Golgi, mitjançant el qual es demostra pèrdua de ramificacions dendrítiques, així com varicositat de les dendrites i pèrdua d'espines dendrítiques que són llocs postsinàptics<sup>22,26-29</sup>. L'alteració de sinapsis també s'ha comprovat mitjançant la demostració de reducció de l'expressió de proteïnes sinàptiques en malalties prioniques humanes i animals<sup>30-34</sup>.

La vulnerabilitat cel·lular no és ben coneguda. Malgrat això, s'ha demostrat que les neurones gabaèrgiques de l'escorça cerebral que són immunoreactives per a la proteïna lligadora de calci parvalbúmina són espe-

cialment vulnerables en les malalties priòniques humanes i animals<sup>35-38</sup>. Aquesta afectació selectiva pot estar en relació amb una reducció de la inhibició cortical i amb la presència d'alteracions en el registre electroencefalogràfic i en l'aparició de moviments mioelòncics en els malalts.

## La proteïna priònica o PrP

PrP<sup>C</sup> és una glicoproteïna ancorada en la membrana cel·lular amb quatre dominis helicoidals- $\alpha$  i dues cadenes laterals de carbohidrats lligats a asparagina. En les malalties priòniques, la PrP<sup>C</sup> es transforma en una isoforma plegada anormalment en làmines  $\beta$  que és patogènica<sup>39-44</sup>. PrP<sup>Sc</sup> mostra propietats particulars com són la resistència a diferents agents, inclosa la resistència a les proteases<sup>45</sup>.

La PrP<sup>C</sup> té un pes molecular de 27 kDa-35 kDa<sup>3-9</sup>. Les diferències de pes molecular són degudes a canvis posttranslacionalis produïts per glicosilació<sup>46</sup>.

La PrP<sup>C</sup> es troba en neurones<sup>47</sup>, astròcits<sup>48,49</sup>, micròglia<sup>50</sup>, limfòcits<sup>51</sup>, cèl·lules fol·liculars dendrítiques<sup>52</sup>, cèl·lules musculars<sup>53</sup> i diferents cèl·lules tumorals<sup>54</sup>. La PrP<sup>C</sup> s'uneix a la membrana mitjançant un ancoratge GPI (grup glicosil-fosfatidil-inositol) i està àmpliament representada en diferents animals, encara que té característiques pròpies d'espècie<sup>55</sup>. Aquestes diferències de la PrP han explicat certa barrera o resistència de contagiositat priònica entre les espècies.

La funció de la PrP<sup>C</sup> no és coneguda. Els ratolins sense PrP creixen normalment, i no s'observen alteracions en el sistema nerviós ni muscular a l'edat de 24 mesos<sup>56,57</sup>. Malgrat això, s'han descrit alteracions dels ritmes circadianis i del son<sup>58</sup>. També s'ha observat una alteració de la potenciació a llarg termini i una reducció de la inhibició ràpida mediada per receptors GABA<sub>A</sub> en seccions d'hipocamp de ratolins sense PrP<sup>59</sup>. D'altra banda, no s'han observat alteracions en l'excitabilitat neuronal i en la transmissió sinàptica en la regió CA1 de l'hipocamp ni a les cèl·lules Purkinje del cerebel<sup>60,61</sup>. Malgrat això, altres treballs han mostrat disrupció de corrents de potassi mediat per calci en seccions d'hipocamp de ratolins sense PrP<sup>62</sup>. Alguns animals sense PrP generats al Japó mostren atàxia i pèrdua de neurones de Purkinje amb l'edat<sup>63</sup>, però aquestes anomalies no s'han observat en els ratolins sense PrP generats en altres llocs<sup>64</sup>. Aquestes dades indiquen que la PrP<sup>C</sup> participa d'una manera aparentment subtil en la transmissió sinàptica.

Curiosament, els ratolins que tenen un excés de PrP<sup>C</sup> mostren miopatia necrotitzant, neuropatia desmielinitzant i vacuolització focal en el sistema nerviós central<sup>65</sup>.

Se sap que la regió octapeptídica repetida de PrP té llocs d'unió al coure<sup>66-69</sup> i que la PrP pot regular el transport de coure i jugar un paper en l'estat oxidatiu de les cèl·lules com a mitjancer en el procés neurodegeneratiu<sup>70</sup>, actuant com una coberta (*chaperone proteins*) de coure<sup>71</sup>. La unió al coure modifica l'estructura secundària i terciària de la proteïna i canvia la seva sensibilitat a la proteïnasa<sup>72</sup>.

## El gen de la PrP o *PRNP*

El gen que codifica la PrP s'ha identificat i clonat en diferents espècies<sup>73-76</sup>. En l'ésser humà la PrP està codificada per un gen situat al braç curt del cromosoma 20. Aquest gen, anomenat *PRNP*, presenta un sol exó que codifica pels 253 aminoàcids de la proteïna. Cal destacar que s'han descrit tot un seguit d'alteracions en aquest gen que són responsables de les diverses formes familiars de la malaltia, així com de la predisposició genètica a patir-la. La presència de mutacions puntuals, polimorfismes genètics, delecions o insercions són fenòmens que podem detectar en l'estudi d'aquest gen<sup>77</sup>.

### *Mutacions puntuals*

Les mutacions puntuals del gen *PRNP* es produeixen per l'intercanvi de nucleòtids en la seqüència nucleotídica del gen. En alguns casos, aquestes modificacions no provoquen la substitució de l'aminoàcid corresponent en la seqüència de la PrP, per la qual cosa s'anomenen *mutacions silencioses*. Fins ara s'han descrit unes 12 mutacions silencioses en el gen *PRNP*.

En altres casos la modificació provoca la substitució d'un aminoàcid en la seqüència proteica que genera una proteïna anormal amb caràcter patogènic. S'han descrit 22 *mutacions patològiques* en el gen *PRNP*, responsables de les diverses encefalopaties espongiformes familiars<sup>78</sup>.

### *Polimorfismes al gen PRNP*

Finalment, es detecten mutacions puntuals que, encara que provoquen canvis en la seqüència nucleotídica de la proteïna priònica, no indueixen al desenvolupament de la malaltia en els individus que en són portadors. La innocuïtat d'aquestes mutacions provoca que evolutivament hagin penetrat en la població i es detectin de forma molt freqüent en els individus sans. En aquest cas, els anomenem polimorfismes i se n'han descrit 6 al gen *PRNP*. Entre aquests, el que afecta el codó 129 és un dels més coneguts per la seva freqüència i per la seva implicació en la susceptibilitat a patir la malaltia. Existeixen dos al·lels en la població, que es diferencien per la presència d'una metionina o una valina en el residu 129 de la PrP.

Hi ha, per tant, tres tipus de genotips: l'homozigot per metionina (MM), l'homozigot per valina (VV) i l'heterozigot (MV).

### **Insercions i delecions en el gen PRNP**

Existeix una regió situada entre els codons 51 i 91 del gen *PRNP*, constituïda per un seguit de 5 dominis repetitius de 24 bases que codifiquen per grups de 8 aminoàcids i que per aquest motiu s'anomenen *octarepeats*. A causa de la similitud entre la seqüència d'aquests *octarepeats*, es poden produir insercions o delecions d'un nombre divers d'aquests dominis. S'han detectat insercions que van d'1 a 9 extra *octarepeats* en malalts de 20 famílies afectats d'EET familiar. Es considera que aquesta alteració genètica és la responsable del desenvolupament de la malaltia en aquests pacients. Les delecions en aquesta regió 51-91, en canvi, no estan relacionades amb la malaltia i es detecten amb baixa freqüència en la població sana<sup>79</sup>.

### **Propagació de PrP<sup>Sc</sup>**

Després de la inoculació intracerebral de proteïna prionica anormal, la quantitat de PrP<sup>Sc</sup> augmenta, a la vegada que la quantitat de PrP<sup>C</sup> disminueix, cosa que suggereix que la PrP<sup>C</sup> normal es converteix en PrP<sup>Sc</sup><sup>4</sup>. Més encara, es requereix la presència de PrP<sup>C</sup> per patir la malaltia, ja que els ratolins sense PrP són resistents a la infecció quan s'inocula PrP<sup>Sc</sup><sup>43,56,80,81</sup>. L'expressió constitutiva de PrP<sup>C</sup> és necessària també per a la infecció *in vitro*, ja que les cèl·lules corticals sense PrP són resistents al pèptid patogènic<sup>82</sup>. Els ratolins sense PrP són resistents a la infecció fins i tot quan els nivells de PrP<sup>Sc</sup> augmenten<sup>83</sup>. La introducció de PrP<sup>C</sup> d'hàmsster en ratolins sense PrP restaura la susceptibilitat a la infecció per prions d'hàmsster, però no per prions de ratolí<sup>80,84</sup>.

L'expressió específica de PrP<sup>C</sup> en les neurones és suficient per rebre i propagar la malaltia, almenys després de la inoculació intracerebral de PrP<sup>Sc</sup><sup>85</sup>. Malgrat això, aquesta via no explica la majoria de formes d'EET en els humans i en animals. S'ha observat que les cèl·lules fol·liculars dendrítiques són un compartiment patogènic en la progressió de la tremolor ovina<sup>52,86</sup>. També se sap que les deficiències de limfòcits B endarrerixen o impedeixen el desenvolupament de la malaltia<sup>87</sup>, si bé no és necessària l'expressió de PrP en els limfòcits B perquè es produeixi la progressió de la malaltia<sup>88</sup>. Sembla que la implicació de limfòcits B és més important que la fracció de cèl·lules fol·liculars dendrítiques en la progressió de la tremolor ovina<sup>64,89</sup>. Malgrat això, no és clar com els limfòcits entren en contacte amb la PrP i quines estructures de membrana permeten la interacció de PrP amb els limfòcits. Tampoc no és clar com els limfòcits



actuen de pont amb les cèl·lules nervioses. S'ha proposat un contacte amb els nervis perifèrics i transport per via axonal al sistema nerviós central. A més a més dels elements cel·lulars, s'ha descobert que la PrP anormal es pot lligar al plasminogen, la qual cosa permetria una forma de transport complementària de PrP a la sang<sup>90</sup>.

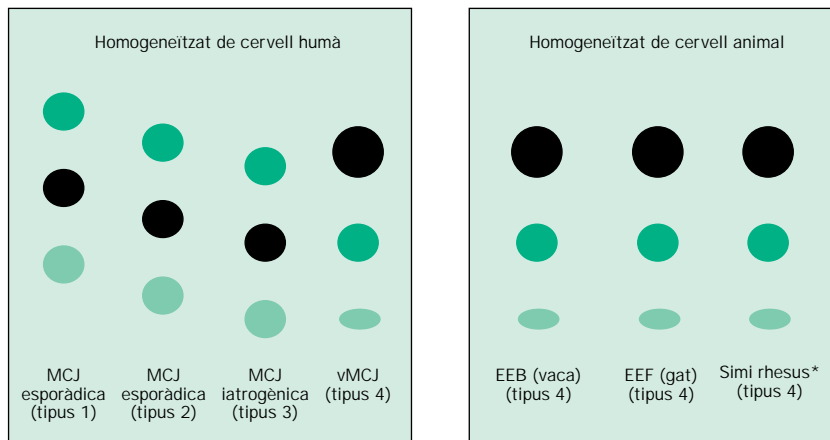
Un cop en el sistema nerviós, la implicació de cèl·lules intermediàries en la propagació de PrP i en el dany neuronal ha estat destacada en diferents models *in vitro* i *in vivo*<sup>89,91-93</sup>. Les cèl·lules astroglials contenen PrP<sup>48</sup>, apareixen infectades en fases precoces de la malaltia cerebral<sup>94</sup> i presenten alteracions en les EET humanes i animals<sup>14,95</sup>. La proliferació astrogliar ocorre posteriorment en paral·lel amb el progressiu dipòsit de PrP anormal en el sistema nerviós<sup>96,97</sup>. L'aparició d'alteracions neuropatològiques en la tremolor ovina experimental s'associa amb l'expressió de diferents citocines, l'origen glial de les quals no es pot descartar<sup>98-100</sup>. Estudis recents han mostrat expressió de factor nuclear-kappa B en astròcits en tremolor ovina induïda<sup>101</sup>. La concatenació d'aquestes dades és, malgrat tot, difícil. Diferents estudis han mostrat una activació primerenca de la microglia, abans que apareguin altres lesions tissulars, en el cervell de ratolins infectats amb tremolor ovina, i s'ha proposat que l'activació microglial és un factor determinant en el dany neuronal associat a la tremolor ovina<sup>99,100,102-104</sup>.

Estudis amb el pèptid PrP 106-126 han mostrat que el pèptid afavoreix la proliferació astrocitària<sup>93</sup>. Aquest efecte sembla precedit per activació microglial<sup>91,92</sup>, i s'ha proposat una activació astrocitària amb la mediació de factors microglials<sup>105</sup>. D'altra banda, l'excés de PrP afavoreix la toxicitat pel pèptid PrP 106-126 i aquest efecte és mediat per la microglia<sup>105</sup>. Considerades en el seu conjunt, aquestes dades atorguen a les cèl·lules glials un paper crucial en l'afectació del sistema nerviós per tremolor ovina i, potser, per altres prionopaties.

### Caracterització molecular de la PrP<sup>Sc</sup>

L'anàlisi mitjançant transferència Western de la proteïna priònica infecciosa, PrP<sup>Sc</sup>, a partir d'homogeneïtzats de cervell de persones afectades d'EET, permet caracteritzar molecularment la soca del prió en 4 patrons, denominats tipus 1-4<sup>106</sup>. Així, de forma característica en la transferència Western després de digestió amb proteïnasa K s'observen tres bandes: dues bandes de massa molecular més gran que corresponen a formes glicosilades (di, i monoglicosilada) de PrP, i una banda menor de més gran mobilitat electroforètica que correspon a PrP no glicosilada. La mida de les bandes, associada a la proporció de formes glicosilades, és el que defineix els patrons de PrP<sup>106</sup> (figura 1).

Figura 1. Esquema dels diferents patrons de PrP analitzats mitjançant transferència Western després de digestió amb proteinasa K



\* Infectat experimentalment amb prions bovins.

## Localització intracel·lular de la PrP

Estudis *in vitro* han mostrat que la PrP se sintetitza en el reticle endoplàsmic, es transfereix a l'aparell de Golgi i posteriorment es transporta mitjançant vesícules a la membrana cel·lular. També s'ha vist que la PrP<sup>Sc</sup> es diposita en vesícules en el citoplasma i en la membrana cel·lular. Ambdues isoformes es poden extrudir a l'espai extracel·lular<sup>3-6</sup>. Estudis *in vivo* han mostrat el transport de PrP<sup>C</sup> en axons del sistema nerviós central i perifèric<sup>107</sup>. La PrP<sup>Sc</sup> també es pot transportar al llarg de l'axó en models experimentals de prionopatia i en l'MCJ<sup>34,96,108</sup>. La PrP es localitza als botons sinàptics<sup>109,110</sup>, i estudis de fraccionament cel·lular han mostrat PrP<sup>C</sup> en terminals presinàptics<sup>111</sup>. Estudis amb immunohistoquímica i microscòpia electrònica han demostrat la presència de PrP en les sinapsis centrals i en la unió neuromuscular<sup>112-114</sup>.

Després de la injecció, la PrP<sup>Sc</sup> s'acumula en els processos neuronals i en les regions sinàptiques<sup>3,4,17,31,34,115-116</sup>.

## Dipòsit de PrP i alteració sinàptica

Existeixen evidències que la PrP actua en les sinapsis i que hi ha una alteració general de les sinapsis en les malalties prioniques. Malgrat això, la relació causal entre dipòsit de PrP anormal i la pèrdua de proteïnes sinàptiques i de sinapsis no és tan clara. Alguns treballs han destacat la

pèrdua de sinapsis com un fet inicial de les malalties priòniques<sup>117</sup>. Malgrat això, altres treballs no han mostrat una relació estreta entre el dipòsit de PrP o la quantitat de PrP anormal dipositada i la qualitat de pèrdua sinàptica en un determinat sistema neuronal<sup>34</sup>. S'ha assenyalat que l'alteració de terminals axonals succeeix posteriorment a la reducció del nombre de neurones de les quals procedeixen aquests terminals<sup>32,118</sup>. D'altra banda, estudis amb microscòpia electrònica han mostrat absència d'alteracions neurítiques i de terminals en associació amb dipòsits extracel·lulars de PrP anormal<sup>119</sup>. Malgrat això, no es pot descartar que la síntesi i el transport de proteïnes relacionades amb les sinapsis, igual que els d'altres proteïnes, no estiguin modificats en les cèl·lules infectades de PrP anormal.

### PrP i aspectes generals de dany cel·lular. Paper de la glia

El mecanisme de dany cel·lular per PrP<sup>Sc</sup> no és clar. Alguns estudis *in vitro* han mostrat augment de calci intracel·lular i compromís de receptors NMDA en el dany per PrP<sup>Sc</sup><sup>120,121</sup>. El fragment de PrP que conté els aminoàcids 106-126 és resistent a proteases, forma fibril·les i és tòxic en cultius neuronals<sup>82,122-125</sup>. Els possibles lligands no han estat identificats amb seguretat, però proteïnes similars a tubulines semblen ser bons candidats d'unió de PrP exogen amb proteïnes de la cèl·lula en cultiu<sup>125</sup>. El fragment de PrP, malgrat això, no és tòxic per a cèl·lules que provenen d'animals sense PrP<sup>82</sup>. Curiosament, sembla que el dany cel·lular no és directe sinó que requereix la presència de cèl·lules microglials<sup>91,92</sup>. Altres treballs han mostrat la probable implicació dels astròcits en la mediació de dany induït per PrP; la toxicitat del pèptid PrP en cultius corticals depèn de la presència d'astròcits amb PrP<sup>c</sup> i està vehiculada per glutamat<sup>93</sup>. A favor del paper dels astròcits en la mediació del dany neuronal per PrP<sup>Sc</sup> hi ha el fet que la inoculació de tremolor ovina d'hàmsster a ratolins sense PrP, però que expressen PrP d'hàmsster en cèl·lules astroglials mitjançant un promotor lligat a proteïna glial fibril·lar àcida, determina l'aparició de la malaltia en animals receptors<sup>89</sup>.

### PrP i dany oxidatiu

Ratolins que presenten un excés de PrP<sup>c</sup> expressen nivells normals d'ARN missatger de Cu,Zn superòxid dismutasa, però els nivells de la proteïna són més elevats; tenen una menor resistència a l'estrès oxidatiu i un augment dels nivells de peroxidasa de glutatió. Aquestes dades han suggerit que PrP<sup>c</sup> regula l'activitat de Cu,Zn superòxid dismutasa per la influència de la incorporació de coure en la molècula<sup>126</sup>. Així mateix, s'ha

observat una reducció de l'activitat de sintasa d'òxid nítric neuronal (nNOS) en ratolins i en cultius de neuroblastoma infectats per tremolor ovina<sup>127</sup>. Curiosament, els ratolins sense PrP també mostren reducció de l'activitat. A més a més, la localització intracel·lular d'nNOS és diferent en animals normals i en animals infectats per tremolor ovina o en animals sense PrP, cosa que indica que la PrP intervé en la localització, i possiblement en la funció d'nNOS<sup>128</sup>. Altres treballs han mostrat una sensibilitat més gran a l'estrès oxidatiu en neurones i en astròcits de ratolins sense PrP<sup>129,130</sup>.

El cervells d'hàmsster infectats amb tremolor ovina presenten una reducció d'activitat de la superòxid dismutasa mitocondrial<sup>131</sup>. Cultius neuronals infectats amb PrP<sup>Sc</sup> han mostrat un augment en la sensibilitat a l'estrès oxidatiu, així com un augment de la peroxidació lipídica i signes d'apoptosi associats a una reducció de les activitats dels sistemes antioxidants dependents de glutatió i de superòxid dismutasa<sup>132</sup>. En models *in vivo* s'ha demostrat una relació entre l'activitat total de superòxid dismutasa i els nivells d'expressió de PrP<sup>133</sup>. Finalment, s'ha trobat un augment d'immunoreactivitat neuronal a nitrotirosina, que s'utilitza com a marcador d'estrès oxidatiu, en ratolins infectats amb tremolor ovina, fet que suggereix la possibilitat de dany per radicals lliures en les prionopaties<sup>38</sup>.

## Mort cel·lular i dipòsit de PrP anormal

Estudis sobre la tremolor ovina han mostrat mort cel·lular identificable amb el mètode de marcatge *in situ* de l'ADN fragmentat<sup>134,135</sup>. Estudis en l'ésser humà han produït resultats dubtosos a causa de l'efecte *post mortem* sobre la sensibilitat del mètode de marcatge *in situ* d'ADN fragmentat<sup>136-138</sup>. En qualsevol cas, la hipòtesi de treball alternativa i complementària ha estat examinar l'expressió de proteïnes vinculades a fenòmens de mort i supervivència cel·lular en malalties prioniques humanes. Els resultats preliminars han mostrat una resposta complexa en el cerebel en l'MCJ<sup>139</sup>. S'ha observat augment d'expressió de proteïnes senyalitzadores de mort cel·lular en les cèl·lules de Purkinje, relativament resistents a la PrP<sup>CJD</sup>, però no en les cèl·lules granulars més vulnerables a la PrP<sup>CJD</sup>. S'ha trobat caspasa-3 activa en el citoplasma de cèl·lules de Purkinje no associada a mort cel·lular, però també expressió de caspasa-3 activa en cèl·lules amb característiques apoptòtiques de la capa molecular i granular del cerebel. Aquestes dades indiquen que hi ha mort cel·lular per apoptosi en les malalties prioniques, però també que l'apoptosi no és l'única, ni probablement la més freqüent, forma de mort cel·lular en les prionopaties.

## Comentaris finals i perspectives d'estudi

En pocs anys s'han produït descobriments importants per a un millor coneixement de les EET, començant per la particular naturalesa de l'agent causal. Malgrat això, hi ha molts fets encara foscos. Alguns aspectes clau en el desenvolupament i la progressió de la malaltia prionica són: a) vies d'entrada, de les quals es coneix com a molt possible la via alimentària en el kuru, en l'EEB i en la vMCJ, però es desconeix la forma de transmissió en altres casos, com és la forma esporàdica d'MCJ; b) transport de la proteïna anòmala per la sang en la tremolor ovina, en què els limfòcits B tenen un paper rellevant; c) acumulació de PrP<sup>Sc</sup> en òrgans limfoides secundaris, incloent-hi la melsa, els ganglis limfàtics i les tonsil·les, almenys en algunes malalties prioniques, però amb seguretat no en la forma clàssica d'MCJ; d) arribada i propagació en el sistema nerviós central, potser amb la mediació de les cèl·lules glials, astròcits i micròglia, almenys en la tremolor ovina experimental; e) invasió del teixit nerviós, en què és fonamental la presència de PrP normal perquè es produeixi la conversió de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>; f) possible intervenció de proteïnes o agents intermedis que modifiquin la conformació de la proteïna i donin lloc a la isoforma patogènica; g) interacció amb el sistema de transport intraneuronal i amb el sistema de senyalització de les membranes neuronals, incloent-hi proteïnes de membrana i proteïnes associades a la membrana; h) possible ampliació del dany cel·lular per estrès oxidatiu i per dany excitotòxic, aquest últim per mitjà de receptors de glutamat, i i) activació específica i no específica de vies de reparació i de mort neuronal.

## 2. Descripció clínica i patològica de les EET

### 2.1. Descripció clínica i patològica de les EET en els animals

#### 2.1.1. Introducció

La tremolor ovina (*scrapie*) és una malaltia d'aquest grup que afecta les espècies ovina i caprina<sup>140,141</sup>. Deu el seu nom en anglès a la manifestació clínica típica que presenten els animals afectats, una intensa pruija, que fa que l'animal es rasqui fins a produir-se lesions cutànies importants. A més, l'animal afectat presenta el quadre neuropatològic típic d'aquest grup de malalties. És una malaltia endèmica en molts països d'Europa, Àsia i Amèrica. A l'Estat espanyol va ser diagnosticada per primer cop l'any 1984<sup>142</sup>. A causa dels seus peculiars i característics signes clínics, és una malaltia de la qual es tenen referències des del 1732.

L'any 1947 es va descriure en granges dels Estats Units d'Amèrica i d'Europa una encefalopatia transmissible en visons que havien estat alimentats amb carcasses d'ovelles amb tremolor ovina<sup>141,143</sup>. L'eradicació d'aquesta pràctica va eliminar la malaltia.

La malaltia caquètica crònica és una altra EET descrita de forma endèmica en poblacions de cèrvids, cèrvol mula (*Odococephalus hemionus*), cèrvol de cua blanca (*Odococephalus virginianus*) i ant (*Cervus elephus nelsoni*) dels Estats Units d'Amèrica des de l'any 1980. La seva prevalença arriba fins a un 5 % en algunes zones<sup>144</sup>.

L'EEB afecta l'espècie bovina i provoca un quadre lesional degeneratiu i espongiforme al sistema nerviós central, molt semblant al que s'observa en la tremolor ovina. També se l'anomena popularment malaltia de les vaques boges. L'EEB va ser descrita per primer cop l'any 1986 en bovins de producció lletera al Regne Unit<sup>145</sup>. Posteriorment, es va descriure que el mateix quadre lesional afectava remugants dels zoològics anglesos (ant, niala, òrix, cudú gran)<sup>146</sup>. En l'actualitat afecta bovins en la majoria de països d'Europa.

L'encefalopatia espongiforme felina (EEF) afecta l'espècie felina. Des de l'any 1990 se n'han descrit fins a 90 casos en gats domèstics; la majoria dels casos s'han detectat al Regne Unit, encara que hi ha un cas descrit a Irlanda, un a Dinamarca i un a Liechtenstein<sup>147,148</sup>. També s'ha descrit en felins salvatges dels zoos anglesos (puma, guepard, ocelot, lleó)<sup>149</sup>. En tots els casos s'ha relacionat aquesta malaltia amb la ingesta de restes d'ovelles i vaques infectades amb una malaltia prionica, o de pinsos que contenen farines d'origen animal contaminades amb prions<sup>147-150</sup>.

L'encefalopatia espongiforme dels primats (EEP) ha estat descrita de forma natural en el simi rhesus (*Macacca mulatta*)<sup>151</sup>.

No s'han descrit fins avui EET, de forma natural, en el cavall, el porc, el gos, les aus i els peixos.

L'EEB va ser identificada el novembre de 1986, al Regne Unit, per Wells, neuropatòleg del Central Veterinary Laboratory de Weybridge, Surrey, en descriure lesions espongiformes en vaques que presentaven deficiències neurològiques<sup>145</sup>. Estudis retrospectius assenyalaven que els primers casos s'havien observat ja des de l'abril de 1985. Alguns veterinaris, com Withaker, a Ashford, comtat de Kent, havien descrit casos de vaques que presentaven signes neurològics, però no havien pogut establir el diagnòstic de la malaltia.

El 1987 s'inicia l'estudi epidemiològic a càrrec de Wilesmith, també del Central Veterinary Laboratory de Weybridge<sup>152,153</sup>. L'estudi conclou que les vaques s'han infectat en consumir restes ovines infectades de tremolor ovina. Aquestes restes s'han afegit a la dieta bovina, en forma de concentrats o farines, com un suplement ric en proteïna. Posteriorment, una soca d'un agent semblant al que provoca la tremolor ovina a l'ovella s'hauria adaptat a l'espècie bovina. No és una malaltia d'origen genètic, encara que no s'exclou una susceptibilitat hereditària.

El govern anglès va dictar una sèrie de mesures restrictives per tal de controlar la malaltia i protegir la salut pública. El juliol de 1988 es dicta la prohibició de l'ús de proteïnes derivades de remugants per a l'elaboració de farines destinades a la nutrició dels mateixos remugants. La prohibició no es va estendre a d'altres espècies, cosa que va motivar la infecció d'ungulats salvatges (1986-89) i dels gats domèstics i salvatges als zoos anglesos.

### **2.1.2. Quadre clínic**

Les manifestacions clíniques observades són variades, per la qual cosa caldrà tenir en compte per a cada espècie diferents criteris i símptomes.

#### **2.1.2.1. L'encefalopatia espongiforme bovina (EEB)<sup>146,154,155</sup>**

##### ***Criteris generals***

L'edat, ja que el període d'incubació en animals adults és de 3-5 anys. L'EEB sol presentar-se en animals adults, sense diferències per sexe i d'aptitud lletera.

El nombre d'animals afectats simultàniament en un ramat és usualment un o un percentatge petit d'animals.

La manera de presentació i progressió de la malaltia és típicament insidiosa i progressiva en la majoria de casos. La malaltia progressa sense resposta al tractament. Els signes clínics poden precipitar-se/accelerar-

se a causa de l'estrès (transport, malaltia). La duració de la malaltia, des dels primers signes fins a la mort de l'animal, pot ser de dues setmanes fins a un any.

### **Signes clínics neurològics**

Dependran de l'àrea encefàlica afectada, però podem observar:

*Canvis del comportament, del temperament, o de l'estat mental*, són normalment els primers a aparèixer:

- *Canvis del comportament*: aprensió, por o nerviosisme en condicions prèviament familiars; agressivitat cap a altres animals o persones («agressió defensiva», en molts casos l'animal ataca quan no té espai per fugir), també pot intimidar o ser intimidat pels altres.
- *Signes del cap*: solen reflectir algun tipus d'irritació o canvi de la sensibilitat de la cara o del cap, com augment de la freqüència en el llepat nasal, tremolors o sacsejades del cap, moviments bruscos o compulsius del cap en apropar-nos-hi.

*Signes sensorials*: hiperreactivitat al so, als canvis d'il·luminació, al tacte o en apropar-s'hi un observador. Guitzes o cops de peu violents en la manipulació.

*Signes motors*:

- *Canvis en la postura*: cap baix; cifosi; terç posterior baix (parèsia); estació de base ampla (amb les extremitats més separades del normal); recolzament sobre el dors de l'extremitat.
- *Canvis en la marxa*: balanceig lateral excessiu o caiguda del terç posterior (parèsia/debilitat); ensopegades i caigudes; pèrdua de l'equilibri; hipermetria; animal ajagut i incapaç d'aixecar-se.

*Pruija*: típica de la tremolor ovina, sols s'ha observat molt ocasionalment.

### **Signes clínics no neurològics**

Pèrdua general de pes o de condició corporal, normalment sense pèrdua de gana; pèrdua de la producció de llet.

#### **2.1.2.2. La tremolor ovina<sup>140-142</sup>**

##### **Críteris generals**

- Es presenta sempre en animals de més d'un any, i l'edat més freqüent és de 2 a 4 anys.
- Un o pocs animals afectats per ramat.
- Progressió gradual de signes.
- Manca de resposta al tractament.



## Signes clínics neurològics

*Canvis del comportament, del temperament, de l'estat mental o de l'activitat:* moviment continu; allunyament del ramat; resposta estranya als visitants o al gos pastor; agressivitat/depressió; marxa en cercles; recolzament del cap; distracció, trontolleig; hiperreactivitat a sorolls o moviments sobtats. També inclouen:

- *Canvis en la manipulació:* problemes de munyida, oposició a la manipulació del cap, cau a terra quan se'l manipula.
- *Signes del cap:* cruiximent de dents, augment del llepat nasal.

*Pruïja:* l'animal es rasca, es frega, es mossega, provocant pèrdua de llana o de pèl i el desenvolupament de lesions cutànies. Les parts del cos afectades amb major freqüència són: la gropa, especialment al costat de la base de la cua, les extremitats posteriors i, amb menor freqüència, les anteriors, el dors, la part alta del cap (base de les banyes) i els costats o illades. L'animal es rasca contra objectes fixos. També mostra reflex de rascat: en rascar el dors de l'animal aquest respon arquejant-se, mostrant satisfacció, i movent la llengua.

*Signes motors:*

- *Canvis en la postura:* estació de base ampla amb terç posterior caigut o baix; cap baix; dificultat per aixecar-se; postració i incapacitat d'aixecar-se.
- *Canvis en la marxa:* trot; hipermetria; marxa espàstica o rígida; debilitat i parèsia; pèrdua d'equilibri; incoordinació; caigudes; atàxia.
- *Tremolors.*
- *Col·lapse o convulsions.*

## Signes clínics no neurològics

*Alteracions gastrointestinals:* fluid ruminal o saliva gotejant pels narius o per la cavitat oral, temporalment o permanentment.

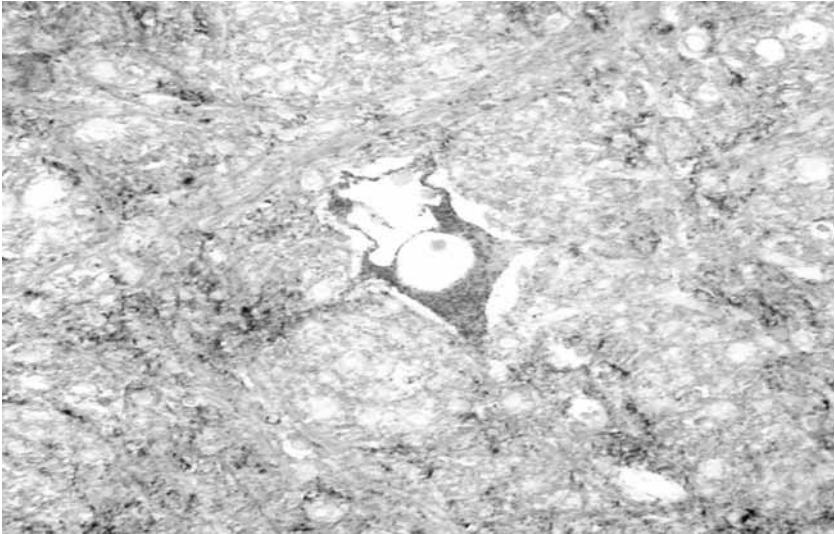
*Canvis en la conformació corporal:* pèrdua progressiva de pes; en casos avançats pot arribar a l'emaciació.

### 2.1.3. Quadre lesional

El patró lesional de l'EEB està format per un conjunt de lesions neurodegeneratives, i la imatge més comuna és la vacuolització que podem observar en regions molt concretes de l'encèfal<sup>145,146,155-158</sup>. La resta de lesions que es descriuran seran observades amb més o menys intensitat i diferent distribució anatòmica segons l'agent etiològic i l'espècie de destí de què es parla<sup>159,160</sup>.

Es tracta sempre de lesions microscòpiques, ja que macroscòpicament no es pot observar cap tipus d'anomalia o alteració<sup>145,157</sup>.

Figura 2. Neurona amb vacúols i neuròpil amb dipòsit de PrP en vaca afectada per l'EEB (tècnica d'immunohistoquímica després de digestió amb proteïnasa K).



És imprescindible, però, per tal d'emetre un diagnòstic definitiu, referir-se a altres factors tan importants com la clínica o els resultats obtinguts amb d'altres tècniques diagnòstiques com la transferència Western de proteïna priònica anormal, així com a l'estudi immunohistoquímic del teixit.

L'estudi histològic permet observar<sup>145,146,155-157</sup>:

*Degeneració vacuolar*: aparició de vacúols en el pericarió neuronal i en les prolongacions neuronals (neuròpil de la substància grisa).

- *Vacuolització del pericarió*: podem trobar un únic vacúol o més d'un (figura 2); solen ser de mida considerable (aproximadament 23-30  $\mu\text{m}$  de diàmetre), circulars i de contorn regular. Amb el microscopi òptic es veuen buits. En casos avançats diferents vacúols d'una mateixa neurona poden fusionar-se, i es perd la regularitat del seu contorn. La vacuolització del pericarió és la lesió més important en la tremolor ovina, i és menys freqüent en l'EEB.

- *Vacuolització del neuròpil*: s'anomena també espongiós i es caracteritza per la presència de múltiples vacúols circulars, de contorn regular. També es veuen buits. Es tracta d'una lesió típica de l'EEB i força menys característica de la tremolor ovina.

*Gliosi* (proliferació de cèl·lules glials) associada a la presència de la vacuolització. Tot i que aquesta gliosi és molt freqüent en les EET humanes, ho és menys en animals. Es tracta d'una astrogliosi hipertròfica (increment en el nombre i grandària dels astròcits).

*Altres lesions neuronals*: degeneració i necrosi neuronals i pèrdua de neurones; de manera menys freqüent, podem observar també imatges de neuronofàgia.

*Amiloïdosi cerebral*: aquesta lesió, observada freqüentment en les EET humanes<sup>161</sup> o en les infeccions experimentals d'animals de laboratori, no és tan comuna en els remugants (en un 5% dels casos d'EEB i fins a un 50% en la tremolor ovina)<sup>162</sup>.

Aquestes lesions es localitzen preferentment als nuclis del tronc de l'encèfal, tot i que es poden estendre a la medul·la espinal o a l'escorça cerebral i/o cerebel·losa<sup>145,156,157</sup>.

En l'EEB<sup>145,146,154-158</sup>, el quadre lesional es localitza inicialment a la medul·la oblonga (nucli del tracte solitari, nucli dorsal del vague, nucli del trigemin, formació reticular i nucli de l'oliva) i al pont del cerebel (nuclis vestibulars superior, lateral i medial, nucli del nervi trigemin, nucli del nervi facial i la formació reticular); aquest quadre es pot estendre rostralment cap al mesencèfal (col·licle anterior, substància grisa central, formació reticular, substància negra i nucli roig) i caudalment cap a la medul·la espinal (banyes dorsal i ventral de la substància grisa). També podem observar lesions a la zona paraventricular del tàlem i a l'àrea septal, i amb menys intensitat al còrtex cerebral, hipocamp i còrtex cerebel·lós. En la gran majoria de casos les lesions són bilaterals i simètriques.

Cal remarcar que no hi ha una relació directa entre la presència de lesió i el poder infectiu del teixit. Mentre que tot l'SNC és infectiu, les lesions es troben concentrades en el tronc de l'encèfal. Tampoc s'ha observat una correlació clara entre la gravetat de la simptomatologia, la gravetat de les lesions i el nivell d'infectivitat del teixit nerviós.

En la tremolor ovina<sup>141,142,162,163</sup> les lesions són més constants i homogènies, i la vacuolització del neuròpil predomina davant els vacúols al pericarió. La zona més afectada és la medul·la oblonga caudal (òbex); en menor intensitat també es troben lesions al pont del cerebel, al mesencèfal (substància negra) i al diencèfal (hipotàlem i tàlem). L'escorça cerebel·losa resulta molt afectada, així com el telencèfal (escorça cerebral, cos estriat i àrea septal). El quadre lesional és freqüentment de presentació asimètrica.

Les fibril·les associades a la tremolor ovina (FAS) són reconegudes com a marcadors ultraestructurals específics de les EET i s'han trobat associa-

des al prió de la tremolor ovina<sup>164</sup>. S'han descrit a l'encèfal en ratolins infectats per tremolor ovina, en pacients amb MCJ i en primats infectats experimentalment amb MCJ i amb *kuru*<sup>165</sup>. A l'ovella amb tremolor ovina les podem observar, mitjançant microscòpia electrònica, en el teixit nerviós (principalment al tàlem, mesencèfal, medul·la oblonga i medul·la espinal), hipòfisi, ili distal i còlon proximal, nòduls limfàtics mesentèrics i mediastínics, i melsa<sup>166</sup>. Aquest material fibril·lar forma part de les plaques amiloides (amiloidosi cerebral), observades principalment a l'encèfal oví.

## 2.2. Descripció clínica i patològica de les EET en els humans

Hi ha tres tipus de malalties produïdes per prions en els humans: esporàdiques, adquirides per contagi des d'un altre animal o ésser humà i hereditàries (taula 2).

### 2.2.1. Malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica

La malaltia afecta sobretot persones grans, entre els 50 i 75 anys, amb un pic entre els 60 i 65 anys. També pot afectar, rarament, subjectes més joves. Hi ha un lleuger predomini en dones.

#### *Fase de començament*

Aproximadament un 25% dels malalts tenen símptomes prodròmics que solen ocórrer entre setmanes i mesos abans del començament de la demència. La simptomatologia és de tipus constitucional-vegetatiu. El pacient té astènia i trastorns de l'apetit (anorèxia o, molt més sovint, bulímia) i del ritme del son. A conseqüència d'això, no és rara la pèrdua de pes. La pèrdua de la libido és més difícil de valorar, tenint en compte l'edat de presentació de la malaltia. A vegades, el malalt es queixa simplement de no trobar-se bé. Sigui amb aquesta fase prodròmica o sense ella, el començament de la simptomatologia neurològica es manifesta per incapacitat de concentració, dèficit de la memòria recent i dificultat per realitzar les tasques diàries.

Generalment la malaltia s'instaura en el curs de setmanes o mesos. En un 15% dels casos el començament es pot establir en cosa d'uns dies i rares vegades de forma aguda com un ictus. La demència sol ser precoç, i als símptomes esmentats s'associa amb freqüència una modificació de la conducta que pot ser del tipus apatia, depressió, manca de la cura de si mateix o fins i tot trastorns més rellevants com paranoia, episodis de desorientació o al·lucinacions que poden imitar un quadre psiquiàtric. Altres signes i símptomes inicials són de tipus cerebel·lós (atàxia, disàrtria, incoordinació de les extremitats) o visual (visió borrosa o diplopia). La ce-

falea i els vertígens són menys comuns i els trastorns sensitius i els moviments anormals són rars.

### **Fase d'estat**

La demència és una síndrome constant en aquesta fase; el dèficit de la memòria es fa molt manifest, i afecta tant la memòria recent com la remota. Les manifestacions psiquiàtriques ja esmentades són freqüents i la demència es fa global, apareix alteració de funcions corticals superiors, afàsia, apràxia i agnòsia. L'afàsia és de predomini motor, que abocarà més o menys aviat al mutisme. S'ha de dubtar del diagnòstic d'MCJ si en la fase d'estat no hi ha alteracions del llenguatge. L'agnòsia visual no és rara i pot ser d'aparició precoç. La ceguesa cortical és bastant típica de la malaltia, però no es pot detectar fàcilment.

La síndrome cerebel·losa és freqüent i es pot observar en el 70% dels casos; dona lloc a una atàxia greu, que juntament amb la síndrome extrapiramidal i piramidal confina el malalt al llit.

Els moviments involuntaris són comuns, sigui del tipus coreic i/o atetòtic. De vegades hi ha tremolor d'actitud o de repòs, de tipus parkinsonià.

Però el més típic i freqüent són les mioclònies. Poden ser focals i arítmiques, i afectar asincrònicament diferents grups musculars; a vegades són unilaterals. Les mioclònies poden aparèixer espontàniament i sobretot es precipiten per estímuls externs: tàctils, visuals i especialment acústics. Són més evidents a la meitat superior del cos. Les mioclònies més característiques són les generalitzades, que poden aparèixer espontàniament i de forma repetitiva i que coincideixen amb les descàrregues periòdiques de l'electroencefalograma (EEG), característiques de la malaltia.

En alguns malalts només apareixen aquestes mioclònies generalitzades a l'estimulació, sobretot acústica. S'observa una reacció de sobresalt exagerada. Les mioclònies constitueixen, juntament amb la demència subaguda d'aparició tardana (60-75 anys), les manifestacions típiques de la malaltia.

L'afectació de la motoneurona perifèrica és rara. Quan s'aprecia l'amiotròfia sol ser d'aparició tardana i s'acompanya d'altres manifestacions clíniques de la malaltia. Actualment es creu que la majoria de casos de demència amb amiotròfia no són transmissibles experimentalment<sup>167</sup>, i la seva relació amb l'MCJ esporàdica no està establerta. La majoria de casos són probablement variants de l'esclerosi lateral amiotròfica associada a demència.

En l'MCJ, les crisis epilèptiques són poc freqüents; poden ser parcials i generalitzades convulsives i quan són parcials motores pot ser difícil distin-

Taula 3. Quadre clínic de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica

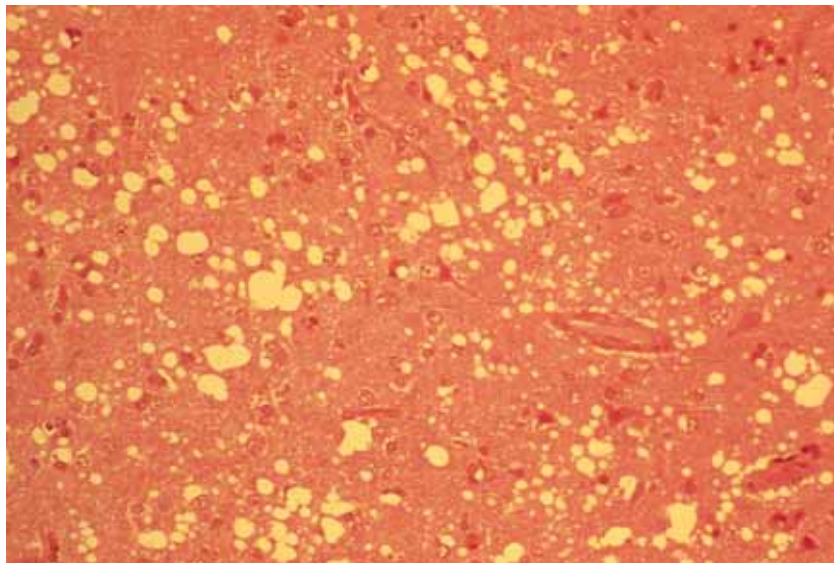
Síntomes i signes	Al començament (%)	En el primer examen (%)	Durant el curs evolutiu (%)
Deteriorament cognitiu	71	84	100
Pèrdua de memòria	52	65	100
Trastorns de la conducta	29	38	55
Alteracions de les funcions corticals superiors (afàsia, apràxia, agnòsia, etc.)	16	36	73
Síndrome cerebel·losa	33	54	70
Alteració visual/oculomotora	19	30	41
Vertigen/mareig	12	14	19
Cefalea	11	12	20
Alteració sensitiva	5	6	11
Hipercinèsies	4	19	88
Mioclònies	0,5	9	80
Altres hipercinèsies (inclou tremolor)	3	10	36
Síndrome piramidal	1,5	16	62
Motoneurona perifèrica	0,5	2	11
Crisis epilèptiques	0	2	20
Síndrome pseudobulbar	0	0,5	7

gir-les de les mioclònies. A la taula 3 s'indica la freqüència amb què es presenten els signes i símptomes de la malaltia al començament, en el primer examen i durant el curs evolutiu, en 209 casos transmesos experimentalment<sup>168</sup>.

### ***Evolució i pronòstic***

El curs evolutiu és progressiu. La motilitat espontània voluntària i involuntària disminueix de manera progressiva, encara que en alguns casos les mioclònies persisteixen fins al final, i el malalt acaba la majoria de vegades en un estat de mutisme acinètic. Si bé la malaltia evoluciona de forma progressiva, no és excepcional que hi hagi períodes d'estabilitat de curta durada. En un petit percentatge de casos d'evolució prolongada, la malaltia pot evolucionar ràpidament amb un període ulterior d'estabilitat o fins i tot hi ha malalts que presenten fluctuacions que a vegades es poden relacionar amb infeccions intercurrents, però en altres no s'aprecia causa aparent. La causa de la mort sol ser una complicació pulmonar. El 90% dels casos moren en menys d'un any i el 70% en menys de 6 mesos, però el curs evolutiu pot ser més ràpid (2 mesos o menys); i en el 10% poden durar 2 anys o més<sup>169</sup>.

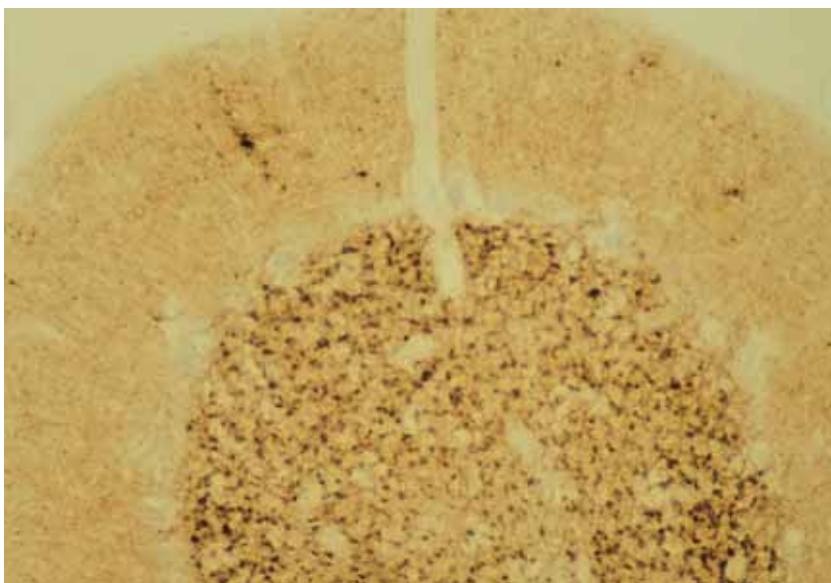
Figura 3. Secció de còrtex cerebral d'un pacient amb malaltia de Creutzfeldt-Jakob (tinció d'hematoxilina-eosina)



### Neuropatologia

L'examen macroscòpic de l'encèfal pot no revelar anomalies significatives, sobretot quan la història clínica és curta, o bé pot mostrar una atrofia global o focal en la inspecció externa. Hi ha tres alteracions histològiques característiques en l'MCJ (figura 3): a) la degeneració espongiforme (canvis espongiformes, i *status spongiosus*); b) la pèrdua neuronal, i c) la gliosi astrocítica<sup>170</sup>. D'aquestes, només la degeneració espongiforme té certes característiques d'especificitat. Les plaques *kuru*, eosinofíliques, arrodonides, són dipòsits extracel·lulars compactes de proteïna prionica que poden ser tenyits amb hematoxilina-eosina, àcid periòdic de Schiff, i roig Congo. Encara que patognomòniques de malaltia prionica, les plaques *kuru* són infreqüents (10% dels casos esporàdics), i són més fàcils de detectar quan s'utilitzen tècniques immunohistoquímiques. El canvi espongiforme consisteix en una fina vacuolització del neuropil de la substància grisa. Pot ser focal, i amb freqüència es detecta en àrees neocorticals, tàlem, ganglis basals, i capa molecular del cerebel. De forma característica l'hipocamp no es veu afectat. La confluència de diversos vacuòls pot constituir cavitats quístiques àmplies. La cavitació marcada

Figura 4. Dipòsit massiu de PrP<sup>Sc</sup> en la capa granular (patró sinàptic)



del neuròpil, generalment acompanyada de pèrdua neuronal i gliosi astrocitària important, és la característica principal de l'*status spongiosus*. No obstant això, també pot observar-se en estadis tardans d'altres malalties neurodegeneratives. La presència de vacuolització neuronal és més característica d'encefalopaties espongiformes en altres espècies com la bovina. La degeneració espongiforme de la substància blanca ha estat descrita en la forma panencefàlica de l'MCJ, que pot estar associada a pèrdua de mielina, gliosi reactiva, i activació de macròfags i micròglia<sup>170</sup>. El marcador diagnòstic més fiable d'EET és la detecció de la isoforma de la proteïna prionica resistent a les proteases. Entre les tècniques de detecció destaca la immunohistoquímica, utilitzant anticòssos anti-PrP (figura 4), per la seva fàcil disponibilitat, ja que permet utilitzar seccions incloses en parafina, i fixades en formalina. Per això, les seccions són bullides en àcid clorhídric al 35% durant 2 minuts, són tractades amb àcid fòrmic al 96% durant 10 minuts, i la peroxidasa endògena bloquejada amb i sense proteïnasa K durant 15 minuts. La incubació amb l'anticòs monoclonal anti-PrP es realitza durant tota la nit, i es detecta mitjançant una tècnica de diaminobenzidina (DAB). Amb la immunohistoquímica es pot



posar de manifest una tinció difusa sinàptica i perivacuolar, i les plaques tipus *kuru* quan aquestes estan presents. La distribució de PrP en l'SNC no està restringida a la substància grisa, tal com mostren les troballes neuropatològiques clàssiques de l'MCJ, i aquesta pot detectar-se en estructures on els canvis espongiformes estan absents, com el tronc de l'encèfal i la medulla espinal. La immunohistoquímica, per tant, és una de les tècniques més fiables, que realitzada en condicions apropiades no és font de falsos positius.

### **Variants de l'MCJ esporàdica**

S'han descrit algunes variants clinicopatològiques de l'MCJ esporàdica, que substancialment són la mateixa entitat, però hi ha un predomini lesional –sobretot l'espongiosi– en algunes regions de l'encèfal, cosa que es tradueix per alguna singularitat clínica o de neuroimatge: a) *la forma de Heidenhain*, que es caracteritza per predomini lesional en l'escorça occipital, la qual cosa es reflecteix clínicament per ceguesa cortical, manifesta a vegades des del començament; b) *la forma atàxica de Brownell-Oppenheimer*, en què la síndrome cerebel·losa domina el quadre clínic; c) *la forma panencefàlica*, en què l'espongiosi de la substància blanca és prominent i en la ressonància magnètica (RM) cranial es tradueix per l'existència d'imatges hiperintenses en T2, en la substància blanca; d) *la forma difusa d'Stern i Garcin*, que es caracteritza perquè les lesions són ostensibles en el tàlem i ganglis basals; e) *la forma corticoestriospinal de Jakob* no denota una simptomatologia clínica especial, llevat que pot cursar amb amiotròfia. Aquestes dues últimes varietats serien formes sobretot neuropatològiques.

Últimament Parchi i col·laboradors han estudiat 300 casos d'MCJ de tipus esporàdic, dels quals en 187 han pogut investigar de forma combinada els factors genètics (el polimorfisme del codó 129) i el tipus de «soca» de PrP<sup>Sc</sup> definit pel patró de mobilitat electroforètica en transferència Western<sup>171,172</sup>.

La forma esporàdica d'MCJ s'associa al patró tipus 1 i al patró tipus 2 de PrP. L'anàlisi combinada d'aquest patró i el del polimorfisme del codó 129 permet distingir sis fenotips clinicopatològics diferents. Els pacients amb el fenotip majoritari clàssic d'MCJ (aquells que presenten la tríada clàssica de demència, mioclònies, i complexos periòdics en l'EEG) tenen el patró tipus 1 associat a homozigosi per metionina (MM1) o heterozigosi (MV1). Les formes atàxiques en les quals la demència és tardana i l'EEG acostuma a ser negatiu, presenten el patró 2 associat a homozigosi per valina (VV2). Un altre subgrup menor de pacients amb atàxia, que presenten demència de forma més precoç, amb EEG no característic, i una llarga duració (> 2 anys), i plaques *kuru* en la neuropatologia, s'associa al patró tipus 2 amb MV (MV2). Els tres fenotips restants representen el 5% dels ca-

Taula 4. Variants de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob esporàdica

Variant d'MCJ esporàdica	Classificació anterior	Casos (%)	Duració mitjana (mesos)	Neuropatologia
MM1 o MV1	Clàssica (mioclònica) i variant Heidenhain. EEG típic	70	3,9	Distribució MCJ clàssica
VV2	Variant atàxica (cerebel·losa). No EEG típic en molts casos	16	6,5	Afectació intensa de nuclis subcorticals, tronc cerebral i cerebel
MV2	Variant placa <i>kuru</i> amb atàxia. Evolució > 2 anys en alguns casos. No EEG típic	9	17,1	És semblant a VV2, però amb plaques tipus <i>kuru</i> al cerebel
MM2 talàmica	Variant talàmica (amb quadre d'insomni letal). No EEG típic	2	15,6	Atròfia talàmica prominent amb poca patologia en altres àrees
MM2 cortical	No establerta	2	15,7	Grans vacúols en totes les capes corticals, cerebel poc afectat
VV1	No establerta	1	15,3	Afectació greu d'escorça i de l'estriat, no afectació del tronc cerebral o cerebel

sos d'MCJ. El fenotip MM2-cortical, en el qual la demència és el principal signe, el VV1 amb signes corticals, demència, i absència d'atàxia i d'EEG característic, i s'ha de destacar que una forma de l'MCJ esporàdica pot cursar clínicament igual que l'ILF (fenotip MM2-talàmic)<sup>172</sup>; de fet, aquest fenotip no es pot distingir de la forma familiar d'insomni letal.

La taula 4 mostra les característiques principals de les subvarietats clinopatològiques d'MCJ relacionades amb factors genètics i el tipus o soca de PrP<sup>Sc</sup>, tot i que aquesta classificació no inclou alguna de les variants d'MCJ i, a més, les formes atàxiques poden correspondre a dos tipus genèticament diferents (VV2 i MV2).

### 2.2.2. *Kuru*

Aquesta malaltia, considerada com a degenerativa del cervell, va ser epidèmica durant un temps en una tribu de Papua Nova Guinea, els *fore*, que practicaven canibalisme. Durant els rituals fúnebres ingerien el cervell dels morts com a senyal de respecte i aflicció. El *kuru* tenia un període d'incubació excepcionalment prolongat, habitualment entre 4 i 20 anys, o fins i tot més.

Els malalts al començament presentaven cefalea i artràlgies com a símptomes prodròmics. Posteriorment apareixia marxa atàxica, incoordinació ce-

rebel·losa i tremolor. S'hi podien associar moviments coreoatetòtics. En les fases avançades apareixia un quadre pseudobulbar, amb disàrtria, disfàgia i riure espasmòdic. Eren rares les paràlisis i els trastorns sensitius. Els pacients morien habitualment als 12 mesos de l'inici dels símptomes neurològics. La paraula *kuru* en llengua *fore* significa tremolor. En els casos pseudobulbars amb riure espasmòdic, els nadius l'anomenaven el «riure de la mort». Aquesta malaltia era més freqüent en nens i dones, ja que, en els rituals de canibalisme que practicaven, aquells eren els que preparaven el cos consumint només aquells teixits no musculars, incloent-hi el cervell. Amb la desaparició del canibalisme en els anys 50 del segle passat, ja no hi ha actualment nous casos d'aquesta malaltia<sup>11</sup>.

### 2.2.3. Malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica

La primera referència publicada d'MCJ provocada per transmissió interhumana apareix en els anys setanta, en relació amb els trasplantaments corneals i amb agulles d'EEG contaminades. El 1985 van sorgir els primers casos en subjectes tractats amb l'hormona del creixement humana procedent de cadàvers. El 1988 es descobreix el primer cas relacionat amb implants de duramàter infectats i intervencions neuroquirúrgiques amb material contaminat. També s'han observat casos per administració de gonadotrofines.

En l'MCJ secundària a tractament amb hormona somatòtropa o gonadotrofines, la proteïna prionica patògena s'introdueix en el cervell per via hematògena. En el cas de trasplantament de còrnia, accedeix al cervell mitjançant el nervi òptic, i en el de les agulles de l'EEG esterotàxica i intervencions neuroquirúrgiques, per via intracerebral. En el cas de les implantacions de duramàter, mitjançant la superfície del cervell.

En els casos secundaris a l'administració d'hormones somatòtropa o gonadotròfica, el quadre clínic es manifesta generalment per una síndrome cerebel·losa, amb poca afectació cognitiva i sense les alteracions de l'EEG típiques. Els malalts denoten trastorns en la seva personalitat, amb apatia manifesta. El període d'incubació és més prolongat, amb una mitjana de 12 o 13 anys. El període d'incubació prolongat i el quadre clínic recorden el *kuru*.

L'MCJ iatrogènica per inoculació central té, en general, un període d'incubació menys prolongat i el quadre clínic evolutiu és més semblant al de l'MCJ esporàdica.

Els casos secundaris a implantacions de duramàter denoten un període d'incubació intermedi i la simptomatologia és de tipus cerebel·lós, demencial, visual i extrapiramidal, combinada amb un clar predomini d'unes d'aquestes síndromes<sup>173</sup>.

L'MCJ iatrogènica en relació amb l'hormona del creixement (origen perifèric, intramuscular) es relaciona amb el patró tipus 3 associat a MV o VV, o al patró tipus 1 quan està associat a MM. En els casos relacionats amb un implant de duramàter, el patró és de tipus 2<sup>106</sup>.

#### 2.2.4. Variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob

Will i col·laboradors, el 1996, van identificar 10 casos que ells van anomenar nova variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ), amb un quadre anatomoclínic diferent dels 200 casos d'MCJ que havien examinat<sup>174</sup>. Aquest estudi es va portar a terme al Regne Unit a causa de l'alarma creada en aquest país per l'epidèmia d'encefalopatia espongiforme bovina i els seus riscos potencials per a l'ésser humà. Tots els casos d'MCJ s'enviaven a la Unitat de Vigilància d'MCJ Nacional.

Fins el mes de setembre de 2001 se n'han registrat 111 casos: 106 al Regne Unit, 4 a França i 1 a Irlanda. El quadre clínic és similar al de l'MCJ: demència progressiva i els altres trastorns neurològics que condueixen a la mort, però amb certes particularitats: a) afecta persones més joves, de 29 anys de mitjana (rang entre 12 i 74 anys); b) la duració de la malaltia és més prolongada, amb una mitjana de 16 mesos i uns límits entre 9 i 38 mesos i c) els símptomes inicials són en forma de trastorns de conducta que poden portar el malalt al psiquiatre, o bé en forma de trastorns sensitius com parestèsies i dolors o en forma d'atàxia.

No es registren els complexos periòdics en l'EEG i la proteïna 14-3-3 es detecta en l'LCR només en el 50% dels casos. És freqüent observar en l'RM craneal hiperintensitat en T2, en el nucli pulvinar (tàlem posterior)<sup>175</sup>. La biòpsia de l'amígdala permet el diagnòstic en detectar la proteïna priònica causal (PrP<sup>Sc</sup>)<sup>176</sup>.

En la vMCJ, la troballa neuropatològica més característica, però no patognomònica, és la presència de plaques tipus *kuru* àmpliament distribuïdes, envoltades per vacúols, que li donen un aspecte de les «plaques florides» com les descrites en la tremolor ovina experimental. El canvi espongiforme és més ampli i evident en ganglis basals, i tàlem, però també passa això en una distribució desigual, més focal, pel còrtex cerebral, i la capa molecular del cerebel. També s'observa una gliosi marcada al tàlem posterior. La immunohistoquímica mostra plaques àmplies, les més grans de les quals corresponen a plaques PrP tipus *kuru*, amb nombroses plaques petites que no són evidents per microscòpia òptica rutinària, que apareixen com a dipòsits individuals i multicèntrics. El dipòsit de PrP s'observa també en un patró pericel·lular en el còrtex i en la capa molecular del cerebel. Les plaques i els dipòsits de PrP pericel·lulars pel cervell i cerebel, són clarament visibles en absència de canvis espongiformes confluents en el neuròpil del voltant<sup>174</sup>.

### 2.2.5. EET familiars

Les EET familiars tenen el seu origen en la presència de mutacions en el gen *PRNP* que codifica proteïnes prioniques anormals que afavoreixen el canvi conformacional a partícula prionica i el desenvolupament i la propagació d'aquesta patologia. Aquestes mutacions poden ser heretades de pares a fills en el si d'una família afectada, seguint un patró d'herència autosòmica dominant. Encara que totes les mutacions afecten el mateix gen *PRNP*, la manifestació clinicopatològica de la malaltia depèn de l'alteració genètica subjacent. Així, cadascuna d'elles es pot associar a unes determinades mutacions o polimorfismes que es defineixen com a genotip.

#### *Penetració de les EET familiars*

La *penetració* és un terme genètic que es defineix com la probabilitat que un determinat genotip produeixi el seu fenotip característic. En aquest cas, la penetració d'una determinada mutació al gen *PRNP* és el percentatge d'individus portadors que desenvoluparan l'encefalopatia espongiforme corresponent. En estudis realitzats sobre l'herència de la mutació E200K, tots els individus portadors varen mostrar una penetració del 100%. És a dir, un portador d'aquesta mutació que visqui els anys suficients acabarà desenvolupant finalment l'MCJ. Per tant, es considera que en les formes familiars de les EET humanes la penetració és completa, independentment que altres factors modifiquin el curs o l'edat d'inici de la malaltia<sup>177</sup>.

#### *Relació fenotip-genotip en les EET familiars*

S'anomena genotip *PRNP* el conjunt de característiques genètiques –delecions, mutacions puntuals, polimorfismes, heterozigosi, etc.– que es detecten al gen que codifica per la proteïna prionica d'un individu. L'expressió d'aquesta dotació genètica és el que s'anomena fenotip, i pot definir les diverses característiques clíniques i neuropatològiques de la malaltia que desenvolupa. Com s'ha descrit anteriorment, existeix una associació entre diversos genotips i les EET familiars de les quals són responsables. Aquest genotip no només afecta la mutació puntual en el gen *PRNP*, sinó que pot venir modificat pel polimorfisme del codó 129. Així, la mutació D178N acompanyada en el mateix al·lel per una metionina (M) en el codó 129 (genotip D178N-129M) es troba associada a l'insomni letal familiar, mentre que la mateixa mutació acompanyada de valina (V) en el residu 129 (genotip D178N-129V) està associada a un fenotip d'MCJ familiar.

En l'actualitat s'han definit 26 genotips del gen *PRNP* associats a diversos fenotips d'aquestes malalties. Els diferents quadres clinicopatolò-

Taula 5. Mutacions més freqüents en les EET familiars

Prionopatia familiar	Mutació més freqüent del gen <i>PRNP</i>
MCJ familiar	E200K, D178N + 129V Insercions d' <i>octarepeats</i> en 51-91
ILF	D178N + 129M
MGSS	P102L, F198S

gics s'engloben dins de les EET familiars següents, que en el nostre àmbit estan associades a determinats genotips més freqüents (taula 5): el genotip E200K-129M és el que s'associa de manera més freqüent a l'MCJ familiar, seguit del genotip d'ILF D178N-129M i del D178N-129V. L'MGSS és molt infreqüent, i es troba associada a un seguit de genotips, entre els quals el més característic és el P102L-129M.

Malgrat la gravetat de la simptomatologia de totes aquestes malalties, s'ha descrit que en un 20% dels casos familiars diagnosticats no es mencionava l'existència d'antecedents familiars durant l'anamnesi del pacient o dels seus familiars. Per aquest motiu, és recomanable realitzar l'estudi genètic dels pacients amb sospita d'EET per descartar el diagnòstic d'EET familiar, durant el desenvolupament de la malaltia<sup>178</sup>.

### 2.2.5.1. Malaltia de Creutzfeldt-Jakob familiar

Si bé els casos familiars d'MCJ tendeixen a ser semblants des del punt de vista clínic i patològic a l'MCJ esporàdica, existeixen diferències. Els casos familiars se solen iniciar abans, uns 12 anys, tenen un curs evolutiu més lent i en general viuen aproximadament uns 18 mesos. La forma més comuna està relacionada amb la mutació puntual en el codó 200 del gen *PRNP*. És responsable de la gran incidència d'MCJ a la regió d'Orava a l'Eslovàquia rural i entre els jueus sefardites que viuen en diferents països d'Europa, el nord d'Àfrica i Amèrica, i en israelians d'origen libi. Excepte pel començament lleugerament més precoç (55 anys), el fenotip (quadre clínic) és indistingible de l'MCJ esporàdica.

La segona mutació més freqüent es troba al codó 178. S'observa en famílies del nord d'Europa i ocasiona una malaltia que difereix de l'MCJ esporàdica en un començament més precoç (que se situa entre els 40 i 50 anys) i una evolució més llarga (un o dos anys) sense EEG periòdic. Menys freqüents són les mutacions en els codons 208 i 210, que s'han detectat sobretot en famílies italianes. Presenten també un fenotip semblant al de l'MCJ esporàdica.

Les altres mutacions associades a l'MCJ són estranyes i s'han detectat en molt poques famílies. Les mutacions tipus insercions produeixen un

fenotip més atípic: començament més precoç (entre els 20 i 40 anys), i una duració més prolongada (5 o 10 anys) que en la resta de mutacions.

### 2.2.5.2. Insomni letal familiar

Descrit el 1986 per Lugaresi i col·laboradors, cursa amb insomni progressiu i intractable associat a trastorns disautònoms provocats per hiperactivitat simpàtica: hipertensió, hipertèrmia i taquicàrdia<sup>179</sup>. A més a més, hi ha atàxia, tremolor i mioclònies. Es pot observar ocasionalment demència franca, però és més comú i prominent el dèficit de l'atenció i de la memòria, desorientació, confusió o al·lucinacions complexes. Hi ha alteracions endocrines: pèrdua del ritme circadiari per a la secreció de melatonina, prolactina i hormona del creixement. La secreció d'hormona adrenocorticotropa està disminuïda, en canvi la del cortisol està augmentada. La mort se sol produir als 13 mesos. Aquest fenotip es deu a la mateixa mutació al codó 178 que produeix els casos familiars d'MCJ. El fet que es produeixi un o altre fenotip depèn del genotip del codó polimòrfic 129: quan aquest codifica metionina sobre l'al·lel mutant 178 es produeix l'ILF i si es codifica valina resulta l'MCJ familiar<sup>180</sup>. En l'ILF, quan l'al·lel normal codifica metionina el quadre clínic és ràpid, i predomina el trastorn del son, mentre que quan codifica valina el símptoma predominant és l'atàxia, i la durada és més llarga.

En l'ILF les alteracions neuropatològiques més constants s'observen en els nuclis ventral anterior i mediodorsal del tàlem, amb una pèrdua neuronal del voltant del 50% amb gliosi reactiva. El còrtex cerebral està poc afectat, amb mínima o lleugera astrocitosi. Al cerebel hi ha un inflament dels axons proximals de moltes cèl·lules de Purkinje, amb lleugera pèrdua de cèl·lules de Purkinje i cèl·lules dels grans. No es troben plaques d'amiloide, i hi ha una pèrdua de neurones d'aproximadament un 50% de les olives inferiors. En casos d'ILF de curta duració, la immunohistoquímica detecta PrP en regions on gairebé no hi ha canvis patològics<sup>181</sup>.

Hi ha referències publicades almenys de 6 casos amb un quadre idèntic al descrit però de forma esporàdica (insomni letal esporàdic), sense antecedents familiars. La soca de PrP<sup>Sc</sup> és la de tipus 2, amb quantitat i distribució similar a la de la forma familiar, però amb una quantitat superior de la isoforma glicosilada. Tampoc no es va detectar la mutació típica del codó 178 d'aquest últim, però tots els casos eren homozigots (MM) per al codó 129<sup>182,183</sup>.

### 2.2.5.3. Malaltia de Gertsmann-Sträussler-Scheinker

Aquesta malaltia familiar es deu habitualment a una mutació puntual al codó 102. El fenotip imita fins a cert punt l'MCJ esporàdica, però es diferencia per: començament entre els 20 i 40 anys i un curs evolutiu més

prolongat. Els símptomes inicials solen ser de tipus cerebel·lós (marxa atàxica, disàrtria, incoordinació en les extremitats). La demència és d'aparició més tardana, en algunes famílies predominen els signes piramidals o extrapiramidals; en d'altres, les paràlisis oculars supranuclears, la sordesa o ceguesa corticals. Les mioclònies són relativament estranyes. No és estranya l'associació de signe de Babinski i areflexia en extremitats inferiors. Altres mutacions causants d'MGSS són: la mutació al codó 105 (paraparèsia espàstica i demència), al codó 117 (síndrome pseudobulbar), i als codons 145, 198 i 217<sup>184</sup>.

En l'MGSS, el marcador patològic són les plaques d'amiloide multicèntriques. Aquestes són més nombroses en la capa molecular del còrtex cerebel·lós, però també són detectades en el còrtex cerebral. La placa consisteix en una gran massa central d'amiloide envoltada de petits dipòsits satèl·lits, i el resultat de la immunotinció amb anticossos anti-PrP és positiu. S'ha de saber que, igual que les característiques clíniques, els resultats neuropatològics, incloent-hi els subtipus de plaques, difereixen en funció de la mutació causant de la malaltia<sup>15</sup>.



## 3. Diagnòstic de les EET

### 3.1. Diagnòstic de les EET en els animals

Tant la tremolor ovina com l'EET poden cursar sense simptomatologia nerviosa evident en alguns casos, per la qual cosa és necessari realitzar un examen neurològic exhaustiu i, tot i així, no evidenciar-se dèficits neurològics. A més, aquestes malalties es caracteritzen per no mostrar cap índex de resposta inflamatòria ni immunitària. Conseqüentment, la valoració de paràmetres hematològics alterats o serològics, en una anàlisi sanguínia, és una eina sense utilitat.

#### 3.1.1. Diagnòstic preclínic

La tècnica més acceptada a la tremolor ovina és la biòpsia de tonsil·la palatina i faríngia ja que demostra una elevada sensibilitat<sup>185</sup>. Tanmateix, la detecció de PrP<sup>Sc</sup> en les biòpsies de tonsil·les depèn de la susceptibilitat o resistència genètica a la tremolor ovina que presenti l'ovella<sup>186</sup>. En el cas de l'EET no s'han obtingut resultats satisfactoris pel que fa a la biòpsia de tonsil·la.

S'han dut a terme estudis en el líquid cefaloraquídi (LCR) per detectar possibles proteïnes específiques de la malaltia, basant-se en els treballs realitzats per Harrington i altres el 1986, que relacionen la presència de proteïnes del grup de la 14-3-3 amb l'MCJ. En casos d'EET s'ha dut a terme el mateix tipus d'investigació, estudiant l'apolipoproteïna E, sense resultats convincents<sup>187,188</sup>.

#### 3.1.2. Diagnòstic clínic

Cal sospitar de la presència de la malaltia davant dels signes nerviosos; ja que aquests no són en la seva majoria diagnòstics, cal tenir en compte en el diagnòstic diferencial: a) malalties infeccioses (listeriosi, ràbia, malaltia d'Aujeszky, etc.) i parasitàries (sarna); b) malalties metabòliques i tòxiques (necrosi cerebrocortical, intoxicació per plom, sopor per raigràs, cetosi nerviosa, hipomagnesèmia, malaltia hepàtica, hipocalcèmia, etc.), i c) lesions que ocupen espai (tumors, abscessos, etc.).

#### 3.1.3. Diagnòstic histopatològic<sup>155</sup>

Permet confirmar un 99,6% dels animals sospitosos clínicament. Cal fer l'estudi de seccions coronals de l'encèfal: cervell, cerebel i, sobretot, del tronc de l'encèfal, incloent, com a mínim, una mostra d'una secció de l'òbex just a la zona caudal del quart ventricle.

És molt important diferenciar les lesions vacuolars, típiques de l'EET (figura 2), de l'artefacte que provoca cavitació del teixit nerviós a cau-

sa de l'autòlisi (encèfal amb aspecte de formatge de *gruyère*)<sup>158</sup>. Per això, les mostres d'encèfal han de ser com més fresques millor i s'han de fixar en formol immediatament després de la seva extracció de l'animal.

Cal recordar que a l'espècie bovina és normal observar vacuolització neuronal en alguns nuclis encefàlics, com el nucli vermell i el nucli del nervi oculomotor. Per això és molt important estudiar seccions que incloguin altres zones per tal de poder considerar que un animal ha donat positiu.

*Demostració de les FAS* mitjançant microscòpia electrònica o per purificació a partir de mostra fresca o congelada tractada amb proteïnasa K i examen a microscòpia electrònica a 30.000 augments<sup>162</sup>.

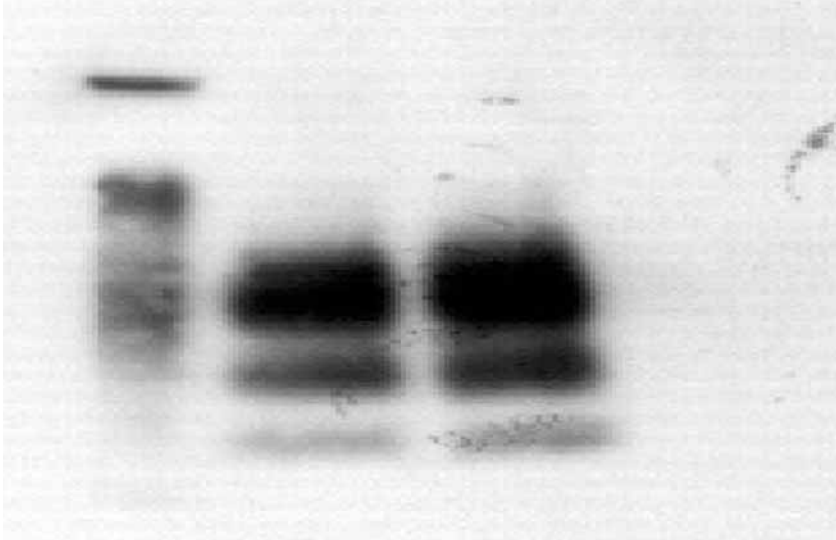
*Detecció de la PrP anormal*<sup>155</sup> mitjançant: a) immunoquímica (transferència Western o ELISA) usant anticossos específics; o b) immunocitoquímica usant fixador especial PLP (periodat-lisina-paraformaldehid) i ajudant la reacció amb autoclau o microones.

*Les proves ràpides i la seva avaluació.* La Comissió Europea ha homologat fins al dia d'avui tres proves ràpides que permeten identificar vaques infectades per l'EEB després del seu sacrifici: a) Test basat en la tècnica de la transferència Western per a la detecció del fragment de la PrP resistent a la proteasa usant anticossos monoclonals, triga unes 4 hores (figura 5); b) Test ELISA quimioluminiscent usant anticossos anti-PrP policlonals, triga 8 hores, i c) Test ELISA tipus *sandvítx* en què s'utilitzen dos anticossos monoclonals dirigits a dos epitops diferents de la PrP, que atrapen la proteïna PrP resistent al mig; el primer dels anticossos ancora la reacció al pouet on aquesta té lloc i el segon està marcat amb un enzim que al final mitjançarà en la reacció de color, triga 24 hores. Els resultats indiquen que tots tenen un potencial excel·lent per detectar o confirmar casos clínics d'EEB, o per comprovar l'estat dels animals sacrificats<sup>189</sup>. L'habilitat de les proves ràpides per descobrir petites concentracions de PrP permet detectar animals infectats abans que desenvolupin els signes clínics (fins a sis mesos abans de desenvolupar el quadre clínic de la malaltia).

Aguzzi i altres col·laboradors han determinat experimentalment en ratolins que el plasminogen sanguini té la capacitat d'aglutinar els prions. Per tant, aquest podria ser un mètode futur per a la purificació ràpida de la PrP<sup>Sc</sup>, per posteriorment evidenciar-lo mitjançant ELISA o bé per transferència Western<sup>190</sup>.

Un estudi més recent<sup>191</sup>, realitzat amb melsa, medul·la òssia i sang de ratolins infectats amb una isoforma de tremolor ovina (Me7) demostra que

Figura 5. Transferència Western de cervell incubat amb proteïnasa K corresponent al segon cas d'EET diagnosticat a Catalunya



existeix una alteració en la línia eritroide dels animals afectats. Es descriuen alteracions en la seqüència d'un factor relacionat amb la diferenciació dels eritròcits anomenat *erythroid differentiation-related factor* (EDRF) que transcriu per una proteïna de 102 aminoàcids de funció desconeguda.

Els tests per a la demostració de la PrP anormal a l'orina i altres fluids semblen prometedors.

### 3.2. Diagnòstic de les EET en els humans

El diagnòstic definitiu de l'EET requereix l'examen histològic de mostres de biòpsia o autòpsia que posin de manifest les troballes neuropatològiques característiques o la presència de la PrP<sup>Sc</sup> mitjançant immunohistoquímica i/o per mitjà de transferència Western. En els casos familiars, el diagnòstic definitiu s'obté mitjançant l'anàlisi del gen de la PrP. Per al diagnòstic en vida, i en absència d'examen histològic, s'han establert uns criteris clínics diagnòstics que inclouen el fet que s'hagi descartat un diagnòstic alternatiu mitjançant les proves complementàries.

## Definició de cas

### MCJ esporàdica

#### a. Cas definitiu o confirmat:

Diagnosticat per tècniques neuropatològiques convencionals i/o demostració de proteïna prionica resistent a la proteasa per immunohistoquímica i/o transferència Western i/o presència de fibril·les associades a la tremolor ovina.

#### b. Cas probable:

Demència progressiva i almenys dues de les característiques clíniques següents:

- Mioclonies
- Alteracions visuals o cerebel·loses
- Signes piramidals o extrapiramidals
- Mutisme acinètic

i

EEG típic durant una malaltia de qualsevol duració i/o detecció de la proteïna 14-3-3 a l'LCR quan la duració és inferior a dos anys i les investigacions rutinàries no suggereixen un diagnòstic alternatiu.

#### c. Cas possible:

Demència progressiva i almenys dues de les característiques clíniques següents:

- Mioclonies
- Alteracions visuals o cerebel·loses
- Signes piramidals o extrapiramidals
- Mutisme acinètic

i

l'EEG no és típica o no s'ha realitzat, i no es detecta proteïna 14-3-3 a l'LCR o no s'ha realitzat i la duració és menor de dos anys i les investigacions rutinàries no suggereixen un diagnòstic alternatiu.

### MCJ iatrogènica

Síndrome cerebel·lós progressiu en un receptor d'hormones hipofítiques d'origen cadavèric, o

cas d'MCJ esporàdic confirmat i exposat a un factor de risc rellevant (trasplantament de còrnia, implantació de duramàter, etc.).

### **EET familiar**

Cas d'EET confirmat o probable més el diagnòstic d'EET confirmat o probable en un familiar de primer grau, i/o trastorn neuropsiquiàtric més mutació al gen *PRNP*.

### **Variante de l'MCJ**

#### **a. Cas definitiu o confirmat**

Confirmació neuropatològica.

#### **b. Cas probable**

Trastorn neuropsiquiàtric progressiu i duració de la malaltia > 6 mesos i les investigacions rutinàries no indiquen un diagnòstic alternatiu i no hi ha antecedents d'exposició iatrogènica potencial i almenys quatre de les manifestacions clíniques següents:

- Síntomes psiquiàtrics inicials
- Síntomes sensitius persistents
- Atàxia
- Mioclonies, corea o distonia
- Demència i

l'EEG no mostra les troballes típiques de l'MCJ esporàdica (o no s'ha realitzat) i

hipersenyal en els nuclis pulvinar bilateral a l'RM.

#### **c. Cas possible:**

Trastorn neuropsiquiàtric progressiu i duració de la malaltia > 6 mesos i les investigacions rutinàries no indiquen un diagnòstic alternatiu i no hi ha antecedents d'exposició iatrogènica potencial i almenys quatre de les manifestacions clíniques següents:

- Síntomes psiquiàtrics inicials
- Síntomes sensitius persistents
- Atàxia
- Mioclonies, corea o distonia
- Demència i

l'EEG no mostra les troballes típiques de l'MCJ esporàdica (o no s'ha realitzat).

Malgrat l'alta fiabilitat d'aquests criteris s'ha de considerar la realització d'un estudi autòptic a tots els pacients amb sospita d'EET. La biòpsia cerebral en pacients vius, no obstant això, només es recomana quan hi ha sospita d'un diagnòstic alternatiu potencialment tractable.

### 3.2.1. Proves complementàries

#### 3.2.1.1. Anàlisis hematològiques

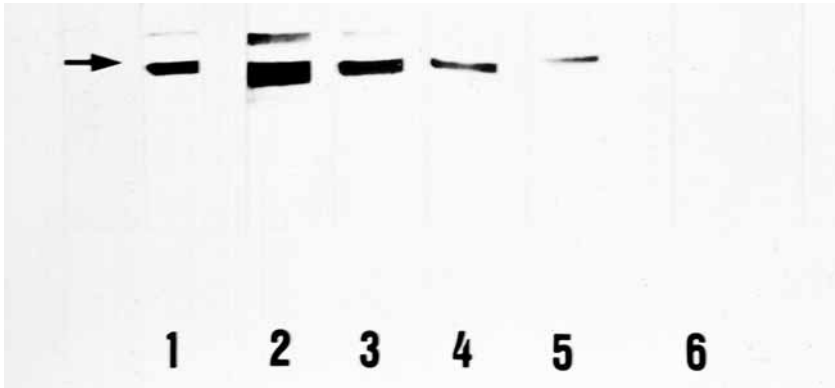
Tant l'hemograma com la bioquímica sanguínia no denoten alteracions tot i que en un 25 o 30% dels casos es detecta un lleuger augment dels enzims hepàtics del qual es desconeix la causa. A diferència d'altres malalties originades per altres agents infecciosos, els marcadors d'inflamació són normals i no s'observa cap tipus de resposta immunològica davant la PrP<sup>Sc</sup> que pugui establir el diagnòstic. En canvi, de manera sorprenent, una mostra de sang pot establir un diagnòstic definitiu en els casos familiars, ja que permet obtenir el DNA necessari per detectar mutacions al gen *PRNP*.

#### 3.2.1.2. Anàlisis del líquid cefaloraquídi

El líquid cefaloraquídi (LCR) és de pressió normal, acel·lular, amb una dosificació d'immunoglobulines normal i sense bandes oligoclonals, i amb un contingut normal o lleugerament augmentat de proteïnes (rarament superior a 100 mg/dl).

En un estudi de 1986<sup>192</sup>, es va observar que dues proteïnes cerebrals normals, anomenades 130 i 131, detectades a l'LCR per electroforesi de doble dimensió, es correlacionaven de forma sensible i específica amb el diagnòstic de l'MCJ. Tanmateix, la tècnica era tediosa i requeria concentrar l'LCR. El descobriment que les proteïnes 130 i 131 pertanyen a la família de les proteïnes 14-3-3 va permetre a Hsich i altres<sup>193</sup> desenvolupar una tècnica més senzilla per a la seva detecció a l'LCR, una immunotransferència, que es va mostrar altament sensible (96%) i específica (88%) per al diagnòstic de l'MCJ (figura 6). Els falsos positius del test de la proteïna 14-3-3 corresponien a pacients amb encefalitis herpètica, ictus aguts i hemorràgies subaracnoidals. L'especificitat, no obstant això, augmentava al 99% quan s'estudiaven pacients amb demència als quals se'ls havia descartat un ictus agut. Un estudi prospectiu posterior de Zerr i altres<sup>194</sup>, en el context d'un sistema de vigilància ben desenvolupat com és l'alemany, va confirmar l'alt valor predictiu de la tècnica de detecció de la proteïna 14-3-3 a l'LCR per al diagnòstic de l'MCJ, amb una sensibilitat en l'MCJ esporàdica del 94% i una especificitat del 93%. Els falsos positius (taula 6) corresponien a pacients amb encefalitis herpètica, encefalopatia hipòxica, metàstasis intracerebrals, ictus aguts i quadres paraneoplàsics. És a dir, situacions en les quals hi ha un dany neuronal intens d'instauració aguda o subaguda, i que en general no són causa de diagnòstic diferencial

Figura 6. Immunotransferència de líquid cefaloraquídi que ha sofert immunoreacció amb un anticòs anti proteïna 14-3-3



Columna 1: homogeneïtzat de cervell. Columna 2-5: LCR de pacients amb MCJ. Columna 6: LCR de pacients amb una altra malaltia neurològica.

amb l'MCJ<sup>194,196</sup>. Una altra font de falsos positius és la presència d'un LCR hemàtic, per la qual cosa en aquestes circumstàncies s'ha de considerar la repetició de la punció lumbar. L'alt valor diagnòstic del test de la proteïna 14-3-3 va permetre suggerir als seus autors la possibilitat d'incloure aquestes anàlisis entre els criteris clínics diagnòstics de l'MCJ esporàdica, equiparant el seu valor al de l'EEG (vegeu Electroencefalograma)<sup>197</sup>, i l'OMS el va incloure al febrer de 1998<sup>198</sup>. Un recent estudi prospectiu europeu multinacional<sup>196</sup> ha confirmat la utilitat diagnòstica d'aquest test. La sensibilitat de la tècnica en l'MCJ esporàdica era del 94 %, i l'especificitat del

#### Taula 6. Causes de falsos positius en el test de la proteïna 14-3-3

- Encefalitis herpètica i altres encefalitis víriques
- Ictus aguts
- Hemorràgia subaracnoidal
- Encefalopatia hipoxica
- Tumors intracranials
- Carcinomatosi meníngia
- Malalties neurològiques paraneoplàsiques
- Contaminació hemàtica de l'LCR
- Encefalopatia associada a la tiroiditis de Hashimoto
- Encefalopatia alcohòlica malnutricional

Taula 7. Valor diagnòstic comparatiu de l'EEG i el test de la 14-3-3 en l'MCJ esporàdica<sup>196</sup>

	EEG típic	14-3-3 a l'LCR	EEG típic o 14-3-3 a l'LCR	EEG típic i 14-3-3 a l'LCR
MCJ	144/219	205/219	213/219	144/219
Sense MCJ	11/43	7/43	15/43	3/43
Sensibilitat %	66	94	97	66
Especificitat %	74	84	65	93
VPP %	93	97	93	98
VPN %	30	72	79	35

VPP = valor predictiu positiu; VPN = valor predictiu negatiu.

84 %. La inclusió d'aquest test en els criteris clínics augmentava la sensibilitat del 66 % (quan només és l'EEG positiu) a un 97 % (amb l'existència d'un EEG o una proteïna 14-3-3 positius). Malgrat això, l'especificitat disminuïa del 74 % al 65 %, fonamentalment a costa dels falsos positius de l'EEG. El valor predictiu positiu d'aquest test era del 97 %, i el valor negatiu del 72 %. Aquest valor predictiu negatiu augmentava al 79 % quan, a més de no detectar-se la proteïna 14-3-3, no existia un EEG característic (taula 7). D'aquests resultats es pot concloure, que a la pràctica clínica ens hem de plantejar un diagnòstic alternatiu quan ambdues proves són negatives. Per contra, l'alt valor predictiu positiu (98 %), quan l'EEG és característic i es detecta proteïna 14-3-3, suggereix que la possibilitat d'un error diagnòstic clínic és molt baix.

En els casos genètics, la positivitat del test considerat de forma global és del 50 %. Així doncs, si es tracta d'un ILF (D178N-129M), la negativitat del test de la proteïna 14-3-3 es produeix de forma invariable, tanmateix aquest pot ser positiu quan es tracta de la mateixa mutació però amb valina al codó 129 (genotip d'MCJ familiar)<sup>199</sup>. En els casos de mutació al codó 200 (E200K), o del codó 210 (V210I), la positivitat del test és molt alta, similar a la dels casos esporàdics. En l'MGSS rarament es detecta la proteïna 14-3-3<sup>196</sup>.

L'experiència en casos iatrogènics és més escassa. En termes absoluts, la sensibilitat del test és d'un 77 % (inclou 1/1 trasplantament de còrnia, 7/8 implantacions de duramàter i 25/36 casos d'hormona del creixement)<sup>200</sup>. En el cas de l'MCJ iatrogènica associada a l'hormona del creixement d'origen cadavèric, un estudi francès recent va trobar que la proteïna 14-3-3 era positiva en 11 dels 20 pacients estudiats (55 %), però era molt infreqüent detectar-la en els 3 primers mesos de malaltia. Estudiant els casos negatius amb una segona mostra d'LCR, el percentatge final de positivitat del test s'incrementava fins a un 75 %. La positivitat coinci-



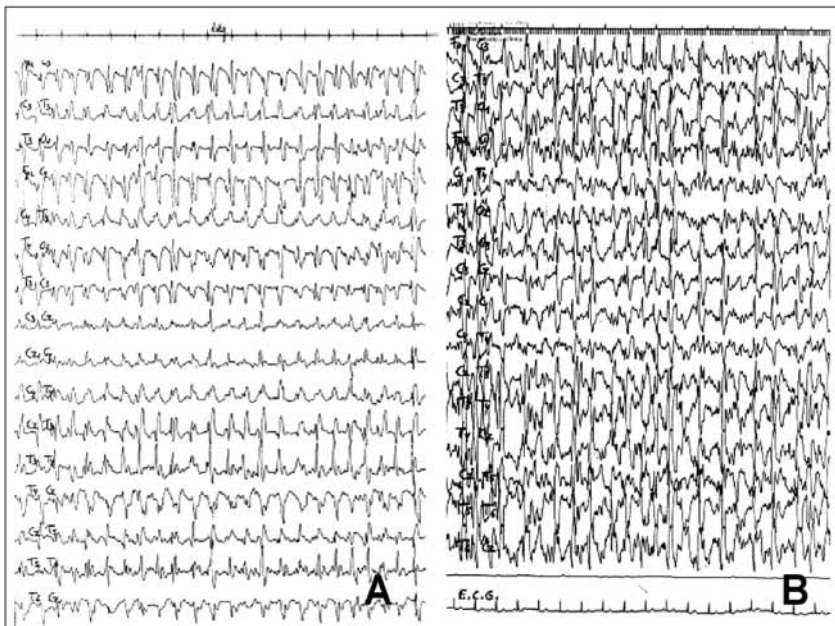
dia amb l'agreujament de la simptomatologia i l'aparició de demència, en general a partir del setè mes de l'inici clínic<sup>201</sup>.

En la vMCJ, la proteïna 14-3-3 només es detecta en el 50% dels casos. Tot i això, en la literatura només es referencia que el test s'ha realitzat a 23 casos<sup>202</sup>.

### 3.2.1.3. Electroencefalograma

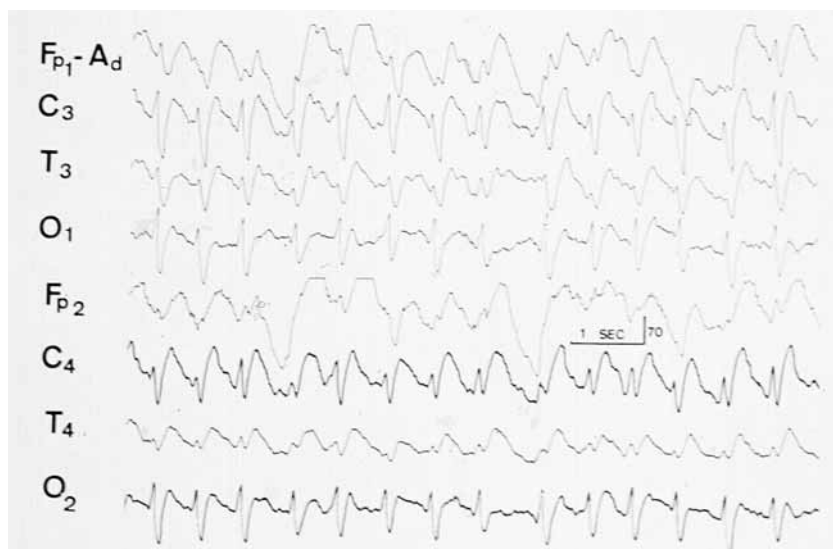
L'EEG va ser reconegut com una ajuda important per al diagnòstic de l'MCJ el 1954, i va ser inclòs dintre dels criteris clínics diagnòstics de l'MCJ esporàdica el 1979<sup>197</sup>. En les fases inicials de la malaltia, l'EEG pot ser normal o mostrar un alentiment inespecífic. En el curs de la malaltia, les alteracions es fan més evidents i apareixen els característics complexos periòdics, bifàsics o trifàsics, síncrons, i superposats al ritme de base que està alentit (figures 7 i 8). El percentatge de positivitat de

Figura 7. EEG en l'MCJ



Complexos periòdics bilaterals, síncrons i simètrics (A).  
Complexos periòdics bilaterals, encara que més expressius en l'hemisferi esquerre (B).  
(Cortesia de la Dra. Rosa Rovira.)

Figura 8. Complexos periòdics característics en l'electroencefalograma



L'EEG en la malaltia és diferent en funció de les sèries examinades. Aspectes tècnics i metodològics s'han implicat en aquesta variabilitat; entre aquests, la definició de complexos periòdics. En l'estudi d'Steinhoff i altres<sup>203</sup> –en el qual es defineix complexos periòdics com potencials cerebrals periòdics, la majoria dels quals tenen una duració entre 100 i 600 mil·lisegons i una variabilitat de l'interval entre complexos entre 500 i 2.000 mil·lisegons– la seva sensibilitat i especificitat eren del 67% i del 86% respectivament. Aquests criteris són avui en dia els reconeguts com a vàlids per al diagnòstic clínic de la malaltia (taula 8). Amb la realització de registres freqüents, el percentatge d'EEG positius pot augmentar; per contra la seva normalitat estricta fa improbable el diagnòstic. No obstant això, altres factors, deixant de banda els tècnics, sembla que també estiguin relacionats amb l'aparició o no dels complexos periòdics, i la seva absència no exclou el diagnòstic. Els complexos periòdics també poden detectar-se en altres encefalopaties, epilèpsia, sobredosi per barbitúrics, intoxicació per liti, etc. (taula 9).

En pacients amb MCJ iatrogènica la positivitat de l'EEG és variable, des de molt freqüent en pacients amb MCJ associada a implantacions de duramàter d'origen cadavèric<sup>204</sup> a molt infreqüent (2/34) en els casos d'hormona del creixement<sup>205</sup>. Els complexos característics no s'han des-

## Taula 8. Criteris d'EEG característic

- 
- Activitat periòdica estricta
  - Variabilitat de l'interval entre complexos entre 500 i 2.000 ms
  - Activitat periòdica contínua d'almenys un període de 10 s
  - Morfologia dels complexos periòdics, bifàsics o trifàsics
  - Duració dels complexos entre 100 i 600 ms
  - Els complexos poden ser generalitzats o lateralitzats
- 

D'Steinhoff i altres<sup>203</sup>.

## Taula 9. Causes de falsos positius a l'EEG

- 
- Malaltia d'Alzheimer
  - Malaltia per cossos de Lewy
  - Malaltia de Binswanger
  - Abscessos cerebrals múltiples
  - MELAS
  - Encefalopatia postanòxica
  - Hiperparatiroidisme
  - Hiponatrèmia, hipernatrèmia
  - Hipoglucèmia
  - Toxicitat per baclofèn, liti, mianserina, metrizamida
  - Hiperamonièmia
  - Demència associada a la sida
- 

crit en el *kuru*, en l'MGSS, ni en la vMCJ<sup>202</sup>. En tots els casos, tanmateix, els EEG seriatos no són normals.

### 3.2.1.4. Electroretinograma (ERG)

En un treball recent<sup>206</sup> s'ha observat afectació bastant precoç de l'ERG en els malalts amb MCJ esporàdica, que traduiria l'afectació de la capa plexiforme més externa de la retina. S'ha detectat en 17 dels 19 casos estudiats una disminució de l'amplitud de l'ona B1 ( $< 60\mu\text{V}$ ) i de la raó B/A ( $< 2$ ) de l'ERG.

### 3.2.1.5. Neuroimatge

La principal funció de la neuroimatge, fins ara, era excloure altres causes que poguessin explicar el quadre clínic del pacient a avaluar. En general, la neuroimatge és normal en els primers estadis de la malaltia. Amb la progressió, la TAC cranial pot mostrar una atròfia generalitzada. En l'RM cranial, no obstant això, es pot observar una hiperintensitat en

Figura 9. RM cranial en l'MCJ



Hiperintensitat, en seqüència potenciada en densitat protònica en ganglis basals. Les fletxes senyalen el putamen i el cap del nucli caudat.

T2 i en densitat protònica en ganglis basals (fonamentalment en nucli caudat i putamen) (figura 9). La revisió retrospectiva ha demostrat que aquestes alteracions poden estar presents fins al 79% dels pacients amb MCJ esporàdica<sup>207</sup>. Alteracions similars en els ganglis basals s'han detectat en la malaltia de Wilson, i en l'encefalopatia hipòxica i mitocondrial, sent l'especificitat per al diagnòstic de l'MCJ d'un 83%. Més recentment s'han detectat anormalitats en altres seqüències (FLAIR) o tècniques (RM-difusió) que permeten observar de forma més marcada la hiperintensitat en ganglis basals, i a més es pot detectar una hiperin-

tensitat cortical, que en alguns casos és aïllada i es correlaciona amb les manifestacions clíniques del pacient<sup>208-211</sup>. Malgrat tot, no es coneix bé quina és la seva sensibilitat i especificitat per ser tècniques molt recents.

En la vMCJ, la troballa més característica és la presència d'una hiperintensitat bilateral en el tàlem posterior (pulvinar) en seqüències potenciades en T2 o densitat protònica a l'RM. En l'estudi inicial amb 36 pacients, les troballes es van detectar en 28 (78 %) amb una especificitat del 100 %<sup>175</sup>; en un estudi posterior es va ampliar la investigació a 52 i es va confirmar la positivitat en el 79 % dels casos. A més, en els casos en els quals es va realitzar l'estudi en seqüències FLAIR la hiperintensitat del pulvinar es posava més de manifest<sup>212</sup>.

### **3.2.1.6. Biòpsia de tonsil·la**

En la vMCJ és possible detectar el príó infecció en teixit limforeticular, per tècniques d'immunohistoquímica i/o transferència Western. La seva negativitat en els casos d'MCJ esporàdica, iatrogènica o familiar, així com en controls ha permès identificar la biòpsia de tonsil·la com un mètode de gran interès per al diagnòstic ante mortem de la malaltia quan es realitza en un context clínic adequat. Mitjançant immunohistoquímica, emprant anticossos anti-PrP, el dipòsit de PrP<sup>Sc</sup> es pot observar dins dels centres germinals, i en relació amb les cèl·lules dendrítiques fol·liculars. En les anàlisis mitjançant transferència Western s'obté un patró similar a l'obtingut amb un homogeneïtzat de cervell, i al qual se li ha donat el nom de patró tipus 4t. La proporció de formes glicosilades a la tonsil·la, aparentment, és similar a la d'origen cerebral existint una major proporció de PrP diglicosilada. Tanmateix, quan es quantifica s'observa que la proporció difereix respecte a la cerebral<sup>176</sup>.

## 4. Epizootiologia i epidemiologia de les EET

### 4.1. Epizootiologia de les EET en els animals

#### 4.1.1. Epizootiologia descriptiva de les EET en els animals

##### 4.1.1.1. Situació general

L'anàlisi epizootiològica de les EET animals constitueix una eina fonamental per conèixer l'extensió d'aquestes malalties a les diferents poblacions animals i caracteritzar els grups d'animals de risc, en funció del seu origen, any de naixement o motiu del sacrifici. A més, permet conèixer les vies de transmissió, la qual cosa és fonamental per implementar mesures preventives de control.

De tota manera, les EET són, per les seves característiques, difícils d'estudiar amb els instruments epizootiològics habituals. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte la inexistència d'un sistema de diagnòstic en viu i l'existència, en el cas de la tremolor ovina, d'un component genètic associat a la transmissió dels prions.

De totes les EET animals descrites, les que tenen més interès, des del punt de vista de la salut pública, són l'EEB i la tremolor ovina. Aquesta última pel seu possible paper en l'origen de l'EEB. De les altres EET, s'ha de tenir en compte que l'encefalopatia transmissible dels visons, descrita als EUA l'any 1947, és una malaltia rara i se n'han produït alguns brots posteriors al Canadà i a les repúbliques de l'antiga Unió Soviètica. L'encefalopatia espongiforme felina (EEF), per la seva banda, està clarament associada a l'EEB, amb l'aparició de 88 casos en gats domèstics a la Gran Bretanya a partir de l'any 1990; posteriorment, a altres països, solament s'ha descrit un cas d'EEF a Irlanda, un a Dinamarca, un a Liechtenstein i un altre a Suïssa l'any 2001. Així mateix, la malaltia caquètica crònica afecta cèrvids d'una zona muntanyosa delimitada als Estats Units d'Amèrica i al Canadà.

##### 4.1.1.2. Tremolor ovina

La tremolor ovina és una EET que afecta el bestiar oví i cabrum. Es va descriure per primera vegada l'any 1732 al Regne Unit, i va quedar demostrat el seu caràcter transmissible, entre ovins, per inoculació intraocular el 1936, amb un període d'incubació d'entre 14 i 22 mesos. Afecta animals d'entre 2 i 4 anys, amb una incidència anual en els ramats afectats de l'1 al 9%.

La incidència global de la tremolor ovina és molt poc coneguda. La seva distribució és universal; és enzoòtica al Regne Unit i té una prevalença

molt baixa a diversos països europeus (Irlanda, França, Suïssa, Alemanya, Noruega, República Txeca i Islàndia). S'ha descrit també a Àsia (Japó), Amèrica (EUA, Canadà i Brasil) i Àfrica (Ghana i Sud-àfrica). Són considerats països lliures d'aquesta malaltia Austràlia i Nova Zelanda. A Espanya té una prevalença baixa; de les estimacions fetes es desprèn que pot afectar el 0,05% dels ramats. En els últims anys s'ha diagnosticat en ramats d'Osca (1984), Saragossa (1986), en altres de Castella-la Manxa i Castella i Lleó<sup>213</sup>, i a la Comunitat Autònoma de Madrid (2001).

La tremolor ovina es transmet, horitzontalment, per via oral pel consum dels líquids i els teixits placentaris de les ovelles infectades que poden infectar els bens nounats i altres animals que comparteixen les mateixes instal·lacions i pastures. Per contra, no són infecciosos la llet, el calostre i la femta. La possibilitat de la transmissió vertical és molt controvertida i els diferents estudis duts a terme no han pogut arribar a conclusions definitives. Sembla que la hipòtesi més consistent apuntaria al fet que la contaminació dels bens nounats es produiria en el moment del naixement pel contacte amb els annexos fetals i les secrecions genitals.

Com la majoria de les EET, la tremolor ovina és transmissible experimentalment a altres espècies de mamífers (ratolí, hámster, conill d'Índies, boví, cabrum, visó i algunes espècies de micos) per via intracerebral, intraperitoneal o oral. Fins al moment, les úniques espècies que han pogut ser infectades en condicions naturals són la cabra i el visó de granja. Malgrat ser una malaltia amb la qual ha conviscut la població humana durant més de 250 anys, no hi ha cap evidència que es transmeti a les persones. Tampoc no s'ha pogut transmetre experimentalment a ratolins transgènics que tenien la proteïna PrP<sup>C</sup> humana.

A diferència de l'EEB, on solament s'ha descrit una soca, fins al moment s'han descrit 20 soques de prions que produeixen la tremolor ovina, que es diferencien, fonamentalment, pel seu període d'incubació i la distribució de la vacuolització neuronal en ratolins transgènics.

La predisposició genètica a la malaltia és una dada a tenir en compte ja que diverses poblacions d'ovins presenten diferents períodes d'incubació i susceptibilitat a la tremolor ovina, segons la configuració del gen que és l'origen de la síntesi de la PrP. Investigadors de l'Institut of Animal Health, d'Edimburg (Escòcia), treballant amb ovelles de la raça Cheviot, van determinar que la susceptibilitat i el període d'incubació estaven condicionats per polimorfismes als codons 136, 154 i 171 del gen de la PrP. En concret, al codó 136 valina (V) o alanina (A), al codó 154 histidina (H) o arginina (R) i al codó 171 glutamina (Q), arginina (R) o histidina (H)<sup>214</sup>. Així, en els animals de la raça Cheviot que tenen glutamina al codó 171, és determinant per a la susceptibilitat la configuració del codó 136. La va-

Taula 10. Genotips del gen PrP d'ovelles Cheviot i Suffolk i susceptibilitat a la tremolor ovina<sup>215</sup>

Cheviot		Suffolk	
Genotip del gen PrP	Susceptibilitat a la tremolor ovina	Genotip del gen PrP	Susceptibilitat a la tremolor ovina
VRQ/VRQ	Molt alta		
VRQ/ARQ	Molt alta		
VRQ/ARR	Baixa		
ARQ/ARQ	Resistent	ARQ/ARQ	Alta
ARQ/ARR	Resistent	ARQ/ARR	Baixa
ARR/ARR	Resistent	ARR/ARR	Resistent

lina confereix susceptibilitat i l'alanina resistència. Els animals amb heterozigosi valina-alanina són susceptibles de patir-la però amb un llarg període d'incubació.

La situació d'homozigosi o heterozigosi per a la valina al codó 136 sembla que és determinant per a la susceptibilitat d'altres races ovines com, per exemple, Île de France, Romanov o Shetland. D'altra banda, l'homozigosi glutamina-glutamina al codó 171 fa susceptibles altres races com Suffolk i Romanov.

Considerant en conjunt els tres codons, la combinació que produiria un període d'incubació més llarg i, per tant, una menor susceptibilitat seria l'homozigosi alanina-alanina al codó 136, arginina-arginina al codó 154 i arginina-arginina al codó 171 (taula 10).

Actualment, s'estan desenvolupant estudis als països amb més alta incidència de tremolor ovina tendents a completar les dades existents sobre la forma de transmissió entre ramats i la seva relació amb la forma de compra dels animals, la utilització estiuenca de pastures col·lectives i l'alimentació. D'altra banda, també s'han iniciat estudis per conèixer en profunditat la forma de transmissió entre els animals d'un ramat infectat i el paper que poden tenir en la disseminació els àcars i els rosegadors salvatges, i la via de transmissió vertical entre ovelles i bens nounats. També s'hi ha començat a fer treballs de modelització per disposar d'un model d'evolució de l'epizootia tant en un ramat concret com en un territori determinat.

Els sistemes de lluita i eradicació de la tremolor ovina es basen en el sacrifici i la destrucció dels animals malalts i dels convivents i la posterior desinfecció de les instal·lacions. Aquesta estratègia molt sovint no té èxit atesa l'extraordinària persistència dels prions en el medi. Les noves tendències d'eradicació d'aquesta malaltia s'orienten envers la selecció



genètica ja que els ovins homozigots ARR/ARR són sempre resistents, fins i tot en medis molt contaminats. De tota manera, per poder dur-la a la pràctica s'ha de garantir que els animals resistents no siguin portadors i disseminadors de l'agent infecciós. El conjunt d'informacions disponibles, fins al moment, indiquen que els ovins resistents amb genotip ARR/ARR no presenten risc de ser reservoris o difusors de l'agent de la tremolor ovina. A més, s'han de tenir en compte les incertituds que encara es tenen sobre un possible pas de l'agent de l'EEB als ovins i, per tant, és important assegurar-se que els ovins resistents a la tremolor ovina no esdevenen reservoris del prió de l'EEB. En aquest sentit, les observacions i els estudis fets fins ara indiquen que els animals resistents a la tremolor ovina també són resistents a l'EEB, sense convertir-se en portadors asimptomàtics. Si es confirmessin aquests primers resultats, l'estratègia d'eradicació podria evolucionar envers una combinació de sacrificis selectius i un reemplaçament a partir d'animals genèticament resistents. En tot cas, abans de generalitzar-se una nova estratègia s'haurien d'obtenir més dades mitjançant un procés rigorós d'avaluació.

#### **4.1.1.3. Encefalopatia espongiforme bovina**

L'EEB, encefalopatia espongiforme transmissible pròpia dels bovins, va ser identificada per primera vegada l'any 1985, a la Gran Bretanya, i declarada el 1986. El seu període d'incubació no és conegut amb precisió, però sembla que és molt llarg, entorn de 5 anys. La incidència anual màxima en els ramats infectats ha estat del 3%.

Amb la descripció dels primers casos d'EEB al Regne Unit es van iniciar, el 1987, estudis epizootiològics sobre diversos factors que podien ser els responsables de l'epizootia d'EEB o que podien afectar la seva evolució futura. En concret, es van tenir en compte el tipus de ramat (producció, mida i piràmide d'edats), la procedència dels animals malalts (nascuts a la pròpia granja, comprats a altres granges o importats d'altres països), els productes farmacèutics i vacunals que havien rebut i els productes zoonosanitaris i fitosanitaris utilitzats a l'explotació, i les pràctiques i la composició dels aliments que havien ingerit al llarg de la seva vida.

Les primeres conclusions de l'anàlisi epizootiològica mostraven el perfil típic d'una epizootia amb una font comuna molt estesa, amb l'aparició de molts casos individuals en explotacions disseminades. No es van trobar evidències de transmissió horitzontal ni d'exposicions comunes a fàrmacs, vacunes ni productes zoonosanitaris ni fitosanitaris. Es va descartar també una possible transmissió a partir d'ovins malalts de tremolor ja que al 20% de les granges afectades per l'EEB no hi havia bestiar oví. L'únic factor comú que es va trobar va ser la utilització de farines de carns i os-

sos en la composició dels pinsos usats a les explotacions afectades<sup>152</sup>. Això, a més, explicava per què les explotacions de producció de llet eren afectades per l'EEB en una proporció molt superior a les explotacions de producció de carn, ja que els pinsos amb un alt contingut proteic són molt més utilitzats en les granges de llet. Finalment, un estudi de casos i controls sobre les pràctiques d'alimentació del bestiar i la inclusió de farines de carn va confirmar la primera hipòtesi<sup>216</sup>.

De l'anàlisi epizootiològica es va confirmar que la causa primera de l'EEB era el consum de pinsos amb farines de carn, però persisteixen els dubtes sobre quina és la font de l'agent de l'EEB, encara que sembla que els canvis en els procediments d'elaboració de les farines de carn i ossos, a partir de subproductes carnis i cadàvers, en les dècades dels 70 i dels 80, haurien permès que l'agent infeccios no fos inactivat i entrés a la cadena alimentària<sup>153</sup>. Hi ha quatre hipòtesis sobre l'origen de l'agent infeccios:

1. Origen a partir de la tremolor ovina, ja que aquesta malaltia és enzoòtica al Regne Unit des de fa més de dos segles. A més, la cabana ovina va incrementar-se durant els anys 80 i possiblement es va produir un augment de la prevalença de la tremolor ovina. És, probablement, la hipòtesi que millor explica les dades epizootiològiques.
2. Exposició a l'EEB, la qual seria una malaltia present a la cabana bovina des de fa molt de temps amb una incidència molt rara, semblant a l'MCJ humana, i que s'hagués transmès amb els canvis en el procés de fabricació de les farines de carn que van deixar d'inactivar l'agent. No hi ha cap raó, però, per justificar que si es tractava d'una malaltia esporàdica preexistent estigués confinada al Regne Unit i que no s'hagués diagnosticat mai abans de 1985. De la mateixa manera, l'aparició de l'EEB en altres països coincideix amb l'exposició provocada per la importació de bestiar i de farines de carn procedents del Regne Unit. Aquesta explicació, encara que no es contradia amb les dades epizootiològiques, sembla menys consistent que la de l'origen a partir de la tremolor ovina.
3. L'origen podria ser una nova soca de tremolor ovina de virulència singular que hauria entrat a la cadena alimentària amb l'aprofitament de subproductes i cadàvers per produir farina de carn. Aquesta explicació implica que la nova soca hauria d'haver sorgit en un ramat determinat, amb una localització geogràfica determinada. Però, l'epizootia de l'EEB va sorgir simultàniament en diverses localitzacions geogràfiques, amb la qual cosa aquesta hipòtesi no és coherent amb les dades epizootiològiques.
4. Importació d'ingredients d'alimentació animal d'Àfrica. En aquest sentit s'esmenten les EET diagnosticades en diversos remugants de zo-

ològics britànics. Sembla, però, que l'explicació més lògica és que els remugants salvatges van infectar-se de la mateixa forma que el bestiar boví, mitjançant l'alimentació amb pinsos amb farina de carn.

Una comissió d'investigació del Parlament del Regne Unit sobre l'EEB i la vMCJ va publicar, l'octubre de 2000, un document –*The BSE Inquiry*– conegut també com l'Informe Phillips. Les conclusions exposades en aquest informe expressaven l'opinió que, probablement, l'origen de l'EEB no serà conegut mai amb certesa. Malgrat això, l'informe es decanta per la hipòtesi que l'EEB va ser originada per una nova soca de prió dels bovins apareguda durant els anys 70 com a conseqüència d'una mutació genètica. A més, declarava no vàlida la teoria que l'epizoòtia d'EEB s'havia originat per un canvi en el tractament de subproductes i cadàvers per a la fabricació de farines de carn, amb l'argument que aquests tractaments mai no havien estat capaços d'inactivar completament els agents de les EET.

De tota manera, independentment de la causa inicial de l'EEB, està molt clar que l'epizoòtia va ser mantinguda i incrementada per l'aprofitament de cadàvers i residus carnis d'animals malalts d'EEB i la seva incorporació, en forma de farines de carn, a l'alimentació del bestiar boví, a mitjan dècada dels 80. La incertitud sobre l'origen no afecta les mesures de control a prendre, principalment la prohibició d'utilitzar farines de carn en l'alimentació dels remugants.

L'episodi principal de l'epizoòtia d'EEB s'ha registrat al Regne Unit i s'han produït casos a altres països motivats per les exportacions des d'aquest país de bovins infectats i de farines de carnis i ossos contaminats. Així, a partir de l'any 1986 es van declarar els primers casos autòctons d'EEB en diversos països europeus (taula 11).

El nombre total de casos fins al juliol de 2001 ha estat de 184.500, dels quals 182.333 s'han produït al Regne Unit. El detall de casos per països es recull a la taula 12.

Taula 11. Anys d'aparició dels primers casos autòctons d'EEB en diversos països europeus

1989	Irlanda
1990	Suïssa
1993	França
1994	Portugal
1997	Bèlgica, Països Baixos, Luxemburg
2000	Alemanya, Dinamarca, Espanya
2001	Itàlia, Grècia, R. Txeca

Taula 12. Distribució per anys del nombre de casos d'EEB en països europeus

País	fins 1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001 (d)	Total
Alemanya	0	0	0	0	0	1 <sup>(a)</sup>	0	3 <sup>(a)</sup>	0	0	2 <sup>(a)</sup>	0	0	7	84	97
Bèlgica	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	9	17	34
Dinamarca	0	0	0	0	0	1 <sup>(a)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1	2	4
Espanya	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	52	54
França	0	0	0	0	5	0	1	4	3	12	6	16	31	161	86	325
Grècia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Irlanda	0	0	15 <sup>(b)</sup>	14 <sup>(b)</sup>	17 <sup>(b)</sup>	18 <sup>(b)</sup>	16	19 <sup>(b)</sup>	16 <sup>(b)</sup>	73	78	83	91	149	62	661
Itàlia	0	0	0	0	0	0	0	2 <sup>(a)</sup>	0	0	0	0	0	0	15	17
Luxemburg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Països Baixos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	10	18
Portugal	0	0	0	1 <sup>(a)</sup>	1 <sup>(a)</sup>	1 <sup>(a)</sup>	3 <sup>(a)</sup>	12	14	29	30	106	170	163	44	578
<b>Total sense RU</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>33</b>	<b>114</b>	<b>120</b>	<b>213</b>	<b>297</b>	<b>494</b>	<b>373</b>	<b>1.790</b>
Regne Unit	446	2.514	7.228	14.407	25.359	37.280	35.091	24.434	14.560	8.151	4.334	4.292	2.301	1.580	356	182.333
<b>Total UE</b>	<b>446</b>	<b>2.514</b>	<b>7.243</b>	<b>14.422</b>	<b>25.382</b>	<b>37.301</b>	<b>35.111</b>	<b>24.474</b>	<b>14.593</b>	<b>8.265</b>	<b>4.454</b>	<b>4.505</b>	<b>2.598</b>	<b>2.074</b>	<b>729</b>	<b>184.123</b>
Rep. Txeca	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Suïssa	0	0	0	2	8	15	29	64	68	45	38	14	50	33	16	370
Liechtenstein	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Altres <sup>(c)</sup>	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4
<b>Total mundial</b>	<b>446</b>	<b>2.514</b>	<b>7.246</b>	<b>14.424</b>	<b>25.390</b>	<b>37.316</b>	<b>35.141</b>	<b>24.538</b>	<b>14.661</b>	<b>8.310</b>	<b>4.492</b>	<b>4.521</b>	<b>2.648</b>	<b>2.107</b>	<b>746</b>	<b>184.500</b>

(a) Casos importats.

(b) Inclosos els casos importats: 5 el 1989, 1 el 1990, 2 el 1991 i 1992, 1 el 1994 i 1995. (Sistema europeu de notificació de les malalties animals.)

(c) Casos importats registrats el 1989 (Illes Maldives: 1; Oman: 2) i 1993 (Canadà: 1). (Informe mensual de l'EEB elaborat pel Regne Unit.)

(d) Dades parcials (juliol 2001).

(Fonts: Oficina Internacional d'Epizooties.)

Figura 10. Distribució de casos d'EEB a Espanya. Juliol de 2001<sup>217</sup>

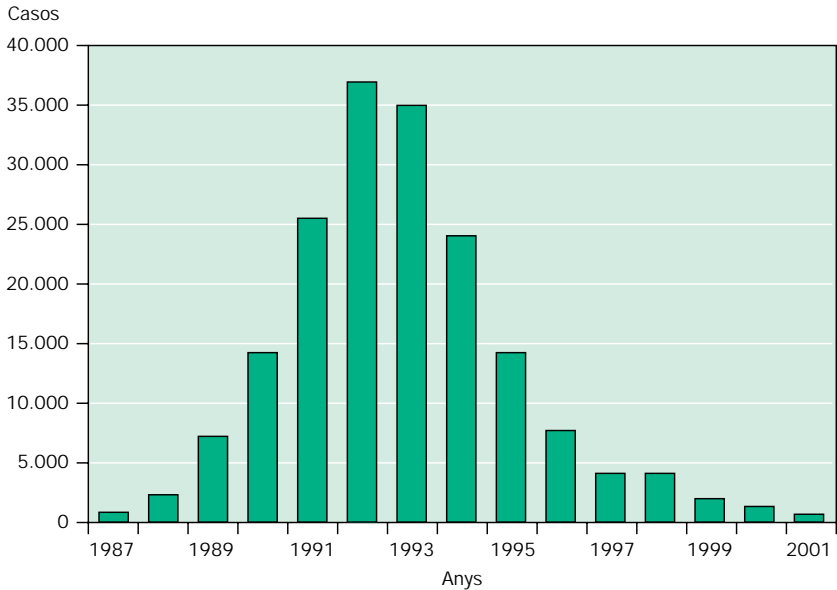


A Espanya, el primer cas es va declarar el 22 de novembre de 2000, i fins al juliol de 2001 s'han declarat 54 casos. Per comunitats autònomes, s'han declarat 23 casos a Galícia; 9 a Castella i Lleó; 5 a les Illes Balears, Navarra i Astúries; 2 a Catalunya i Extremadura i 1 a Castella-la Manxa, País Basc i Múrcia, tal com queda reflectit al mapa de la figura 10.

La incidència de l'EEB és baixa. Al Regne Unit, en el punt més intens de l'epizoòtia, no va superar l'1 % del bestiar adult/any. Encara que algunes explotacions han tingut un gran nombre de casos, aquesta situació és excepcional. El 74 % de les explotacions han tingut 5 casos o menys i el 35 % han tingut un sol cas.

Les dades epizootiològiques constaten, a més, que l'EEB és una malaltia que afecta predominantment el bestiar de producció lletera. En efecte, al Regne Unit, el 63 % de les granges afectades són lleteres, el 27 % són de carn i el 6 % són de producció mixta. Dels animals afectats un 81 % són d'aptitud lletera, un 12 % són d'aptitud càrnia i un 6 % són d'aptitud mixta. A Espanya, dels 54 casos declarats, 46 són d'aptitud lletera (85 %) i 8 d'aptitud càrnia (15 %). La raó d'aquesta major incidència en el bestiar lleter és el tipus d'alimentació, ja que les vaques lleteres requereixen suplement

Figura 11. Evolució de l'epizoòtia d'EEB al Regne Unit



concentrats rics en proteïnes per a mantenir la producció, mentre que la utilització d'aquests suplementos en les vaques d'aptitud càrnia és molt limitada. L'aportació de proteïnes d'alt valor biològic als pinsos es pot aconseguir mitjançant alguns vegetals (soia) o mitjançant farines de carn.

L'edat de l'animal més jove malalt, al Regne Unit, ha estat de 20 mesos (1992) i la del més gran de 19 anys i 9 mesos (2000). A Espanya, el més jove tenia 3 anys i 10 mesos i el més gran 14 anys i 8 mesos.

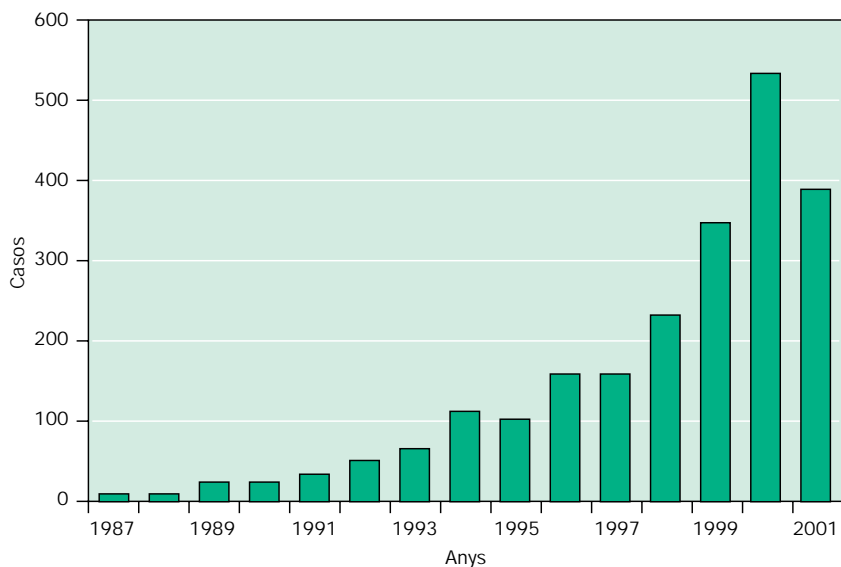
L'evolució de l'epizoòtia, a la Gran Bretanya, és la que es pot observar a la figura 11.

S'ha de tenir en compte que la prohibició de l'alimentació dels remugants amb pinsos que continguessin farines de carn es va produir, al Regne Unit, l'any 1988. Cinc anys després d'aquesta mesura, l'epizoòtia va experimentar una inflexió i l'any 1993 es van declarar menys casos que l'any anterior.

Per contra, l'evolució de l'epizoòtia a la resta de països europeus afectats encara està en una fase ascendent (figura 12).

La prohibició d'alimentar els remugants amb farines de carn al conjunt de països de la Unió Europea (UE) es va produir l'any 1994, amb la qual cosa,

Figura 12. Evolució de l'epizoòtia d'EEB a la resta de la Unió Europea



extrapolant l'evolució de l'epizoòtia al Regne Unit, era previsible un punt d'inflexió amb una disminució dels casos l'any 1999. Tanmateix, l'evolució durant els anys 1999, 2000 i 2001, continua sent ascendent al conjunt de la UE.

Un altre element preocupant és l'aparició d'animals malalts nascuts amb posterioritat a la prohibició de la utilització de farines de carn en l'alimentació, tant al Regne Unit (nascuts després de juliol de 1988) com a la resta de països de la UE (nascuts després de 1994).

Aquests dos fets solament es poden interpretar des de dues hipòtesis. La primera seria l'incompliment de la mesura de prohibició de l'ús de les farines de carn en l'alimentació dels remugants. La segona seria l'existència d'un o diversos mecanismes de transmissió, verticals o horitzontals, diferents de la via alimentària.

En aquest sentit, s'han realitzat investigacions epizootiològiques i estudis específics per intentar esbrinar si l'EEB es pot transmetre per altres vies, diferents de l'alimentària.

Pel que fa a la transmissió horitzontal, d'una banda s'ha de tenir en compte que aquesta és una via de transmissió provada per a una altra EET, la tremolor ovina, mitjançant els líquids i teixits placentaris. D'altra banda,

el fet que la incidència de l'EEB en els ramats afectats no hagi estat mai superior al 2,7 % sembla indicar que la transmissió horitzontal no seria significativa.

Un estudi de casos i controls va analitzar la proporció de vedells que emmalaltien d'entre els nascuts en contacte estret amb vaques malaltes d'EEB i els fills de vaques malaltes<sup>218</sup>. No es va trobar cap evidència de transmissió als fills de vaques malaltes, amb la qual cosa, tenint en compte que els propis fills són els que tenen un contacte més directe amb l'animal malalt, sembla difícil establir que els altres vedells tenen un risc superior d'emmalaltir. Els resultats van ser considerats insuficients per suggerir que hi havia una transmissió horitzontal.

També es va intentar la transmissió via oral amb l'alimentació d'un grup de vedells amb placenta de vaques malaltes d'EEB. Després de set anys els animals van ser sacrificats sense que cap d'ells manifestés cap simptomatologia clínica. Actualment encara s'estan fent assaigs per tal d'esbrinar si els seus teixits eren infectius malgrat no patir la malaltia, i fins al moment no s'ha determinat cap tipus d'infectivitat.

El grup de treball d'Anderson<sup>219</sup> va arribar a conclusions similars tot afirmant que no existeix cap evidència que recolzi la hipòtesi de la transmissió directa horitzontal i tampoc no existeix cap evidència que la transmissió horitzontal estigui ocorrent en una proporció significativa per transformar l'EEB en una malaltia enzoòtica.

Respecte a la transmissió vertical, de la vaca al vedell, s'han realitzat nombrosos estudis epizootiològics. L'Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (SEAC), del Regne Unit, després d'analitzar els resultats, va publicar un dictamen, el 17 d'abril de 1997, en què evidenciava que el risc global de patir l'EEB els animals fills de mares amb simptomatologia clínica d'EEB era un 9,6 % superior al dels nascuts de mares sense la malaltia. Semblava, a més, que aquest risc era més elevat en els vedells nascuts després de l'aparició dels símptomes clínics a la vaca, minvava de forma apreciable en els nascuts en vaques en fase preclínica i no tenia efecte evident si el naixement es produïa dos anys abans de les manifestacions clíniques. De tota manera, no hi ha evidències de si aquest increment del risc és atribuïble a una transmissió vertical directa o si és degut a una susceptibilitat genètica heretada per a la font alimentària d'infecció.

També diferents estudis epizootiològics han comparat la incidència de l'EEB en la descendència de braus sans i altres que, amb posterioritat, han desenvolupat la malaltia. No s'han trobat diferències entre els grups atribuïbles al desenvolupament de la malaltia en els braus. A més, s'han intentat transmissions experimentals usant semen, vesícules seminals i pròstates de braus malalts d'EEB sense que s'hagi detectat infectivitat.



Com a conclusió es pot afirmar que, fins al moment, no s'han trobat evidències consistentes ni de la transmissió vertical ni de la transmissió horitzontal directa, i sembla, a més, que si es produïssin tindrien un valor epizootiològic molt limitat.

S'han realitzat altres estudis per identificar les altres espècies animals susceptibles a la infecció experimental d'EEB i altres possibles rutes de transmissió. Així, s'han realitzat experiments per conèixer la susceptibilitat de diverses espècies animals a l'agent de l'EEB. En aquest sentit, s'ha inoculat material infectiu per via parenteral (intracerebral, intravenosa i intraperitoneal) o per via oral a diverses espècies i s'ha aconseguit transmetre la malaltia al ratolí, als bovins, als ovins, al cabrum i al visó.

Els ovins, als quals s'ha subministrat material infectiu d'EEB per via oral, han emmalaltit amb una distribució de la infectivitat, als seus teixits, similar a la de la tremolor ovina.

L'hàmsster és susceptible a l'agent de l'EEB, però solament després d'haver passat pel ratolí.

Els porcs i les aus de corral han estat exposats durant anys, a l'igual dels bovins, a farines de carn contaminades, tenint en compte, a més, que sovint les farines de carn han entrat en la composició dels seus pinsos en proporcions més elevades que les que s'usaven als pinsos de remugants. Fins al moment, no hi ha cap evidència que s'hagi descobert cap malaltia relacionable amb l'EEB. Els porcs són susceptibles a l'EEB mitjançant la injecció intracerebral de teixit infectiu però no s'han mostrat susceptibles per via oral. En aquest sentit, els teixits de porcs que havien estat alimentats amb material infectiu no van demostrar cap infectivitat en els bioassaigs efectuats amb ratolins. Els estudis realitzats, fins ara, amb pollastres no han aconseguit que aquests animals desenvolupin la malaltia.

Actualment, els estudis sobre la susceptibilitat de les diferents espècies a l'EEB s'estan desenvolupant mitjançant la utilització de ratolins transgènics que porten el gen de la PrP d'altres espècies, la qual cosa permet reduir el període d'incubació i obtenir resultats en menys temps. Especialment importants, en aquest sentit, són els ratolins portadors del gen PrP humà.

L'evolució de la vigilància epizootiològica de l'EEB va estar basada, durant els primers anys d'evolució de l'epizoòtia, en la detecció clínica d'animals amb símptomes compatibles amb l'EEB i la confirmació del laboratori posterior a la seva mort. La generalització de l'ús, a tots els països de la UE, dels tests ràpids de detecció, a partir del més de gener de 2001, aplicats sobre els bovins de més de 30 mesos (a Catalunya als de més de

24 mesos) permet també la detecció d'animals infectats asimptomàtics de les subpoblacions bovines de més risc. Això permetrà, sens dubte, reavaluar l'apreciació sobre la situació epizootiològica.

A Espanya, la vigilància epizootiològica de l'EEB està regulada pel RD 3454/2000 (BOE núm. 307, de 23 de desembre de 2000), el qual preveu, entre altres aspectes, la presa de mostres i la investigació de l'agent causal de l'EEB en:

1. Bovins de més de 30 mesos, morts a les explotacions o durant el transport.
2. Bovins de més de 20 mesos sospitosos de patir l'EEB: amb símptomes neurològics o de comportament on la malaltia no es pugui excloure basant-se en la resposta al tractament o després d'un examen de laboratori.
3. Bovins de més de 30 mesos objecte de sacrifici especial d'urgència.
4. Bovins de més de 20 mesos originaris de França, Irlanda, Suïssa i Portugal.
5. Bovins de més de 30 mesos sacrificats amb destinació al consum humà.

Aquestes subpoblacions són les mateixes que es preveuen investigar, segons el Reglament del Parlament i del Consell europeus 999/2001, de 22 de maig de 2001, pel qual s'estableixen disposicions per a la prevenció, el control i l'eradicació de determinades encefalopaties espongiformes transmissibles.

La realització de tests ràpids de diagnòstic d'EEB és obligatòria, a Espanya, per a les subpoblacions bovines descrites des de l'1 de gener de 2001. Així, doncs, totes les comunitats autònomes (CA) estan aplicant, des de l'1 de gener, els tests sobre els animals de més de 30 mesos destinats al consum humà.

D'altra banda, la població bovina subjecta a investigació està constituïda pel 100% dels bovins de les subpoblacions 2, 3, 4 i 5, i per una mostra de la subpoblació 1, la formada pels bovins de més de 30 mesos morts a les explotacions o durant el transport. Aquesta mostra és el 0,15% de la població de més de 24 mesos de cada una de les CA.

Des del punt de vista epizootiològic, les diferents poblacions objecte d'estudi, mitjançant l'aplicació sistemàtica de les proves ràpides post-mortem, serien:

1. Bovins sospitosos d'EEB = subpoblació 2.
2. Bovins de risc = subpoblacions 1 i 3.
3. Bovins sans = subpoblacions 4 i 5.

Les dades de l'aplicació de les proves ràpides durant el primer semestre de 2001 no permeten extreure, encara, conclusions sobre diferències en la incidència de la malaltia a les diverses CA espanyoles ja que durant els sis primers mesos de l'any s'han produït dos fets que distorsionen les dades i que impedeixen treure conclusions amb un mínim de fiabilitat. En primer lloc, el comportament excepcional del mercat, amb una baixada de la demanda del consum intern i de les exportacions a països tercers, fonamentalment Rússia i altres països de l'est d'Europa, de carn procedent de bestiar de més de 24 mesos per part dels operadors carnis. Això ha fet que els sacrificis «normals» per al consum hagin estat molt inferiors als que estaven previstos. En segon lloc, per la compra, per part del Ministeri d'Agricultura, de bovins de més de 30 mesos amb la finalitat de destruir-los sense la realització d'anàlitzes, segons el que preveu el Reglament (CE) núm. 2777/2000, de 18 de desembre de 2000, pel qual s'adopten mesures excepcionals de suport al mercat de la carn de boví.

A més, per poder extreure conclusions caldrà incorporar una anàlisi de la variabilitat de la configuració de la cabana bovina de cada una de les CA, de les rutes de comercialització, dels sacrificis previstos als seus escorxadors i l'impacte, durant els primers sis mesos de l'any, del procediment comunitari de retirada i destrucció. En aquest sentit, s'ha de tenir en compte que la composició de la cabana bovina de les diferents CA, segons l'edat dels animals, no és homogènia, ja que la proporció de bestiar adult, de més de 24 mesos, és molt desigual, com demostra la taula 13.

Es pot observar, *grosso modo*, que:

- a) Hi ha un grup de CA clarament «especialitzades» en la producció lletera o en la cria de bestiar de carn, amb un pes preponderant, en la seva cabana bovina, de bestiar reproductor. Els paradigmes d'aquest grup serien Extremadura, Balears i Galícia.
- b) Un altre grup de CA estan, al seu torn, «especialitzades» en l'engreix de bestiar per a la producció de carn, amb la qual cosa la seva cabana està composta majoritàriament per vedells d'engreix, molt sovint procedents de fora del seu territori. Els paradigmes d'aquest grup serien Aragó, Múrcia i Catalunya.

La presentació de les dades, per poder fer aquesta avaluació comparativa, haurà de ser homogènia. El percentatge de positius en relació amb el nombre total de tests ràpids efectuats no ens aporta molta informació. No és el mateix, des del punt de vista d'avaluació del risc, que els positius es concentrin majoritàriament entre els animals de més de 30 mesos destinats al consum humà (la qual cosa seria altament preocupant) que, al contrari, apareguin entre les subpoblacions de sacrificis d'urgència i de

Taula 13. Pes relatiu dels animals adults (>24 mesos) en la cabana bovina de les CA

Comunitat autònoma	Bovins totals	Bovins > 24 mesos	(%) de bovins > 24 mesos
Extremadura	433.000	394.000	91
Balears	35.000	29.000	83
Galícia	996.000	702.000	70
Canàries	15.000	10.000	66
Astúries	469.000	303.000	65
Castella i Lleó	1.161.000	732.000	63
Pais Basc	184.000	111.000	60
Andalusia	602.000	347.000	58
Cantàbria	400.000	215.000	54
Madrid	85.000	44.000	52
Navarra	115.000	58.000	50
Castella-la Manxa	297.000	147.000	49
La Rioja	44.000	21.000	47
València	73.000	27.000	37
Catalunya	674.000	171.000	25
Múrcia	39.000	8.000	21
Aragó	344.000	51.000	15

morts a l'explotació. Així, doncs, les taxes de prevalença que s'hauran de calcular són:

- a) Positius entre els bovins sospitosos.
- b) Positius entre els bovins de risc.
- c) Positius entre els bovins sans.
- d) Positius totals en relació amb la població de bovins de més de 24 mesos.

Els resultats obtinguts, durant el primer semestre, amb la utilització massiva de tests ràpids, són encara molt insuficients, pels esdeveniments conjunturals que han fet atípic aquest primer període. Es pot, però, intentar fer una primera aproximació amb les dades disponibles. Per a Espanya, doncs, a causa de la poca qualitat de les dades disponibles –la qual cosa fa que no es puguin associar els casos positius a les diferents subpoblacions–, solament es poden elaborar les taxes de positius per cada 100.000 bovins de més de 24 mesos a cada CA (taula 14).

Pel que fa a les dades dels països de la Unió Europea, se'n poden obtenir de més concretes per subpoblacions, segons la recopilació feta per la Direcció General de Salut i Protecció del Consumidor (DGSANCO) de la Comissió<sup>220</sup>, sobre els resultats dels cinc primers mesos de l'any 2001 (taula 15).

Taula 14. Nombre de tests positius i ràtio per cada 100.000 bovins adults (>24 mesos) per CA

Comunitats autònomes	Positius	Cens > 24 m	Positius per 100.000
Balears	5	29.000	17,24
Múrcia	1	8.000	12,50
Navarra	5	58.000	8,62
Galícia	23	702.000	3,27
Astúries	5	303.000	1,65
Castella i Lleó	9	732.000	1,23
Catalunya	2	171.000	1,16
País Basc	1	111.000	0,90
Castella-la Manxa	1	147.000	0,68
Extremadura	2	394.000	0,50
Aragó	0	51.000	0
La Rioja	0	21.000	0
València	0	27.000	0
Andalusia	0	347.000	0
Canàries	0	10.000	0
Cantàbria	0	400.000	0
Madrid	0	44.000	0

Les conclusions que es poden extreure, després de sis mesos d'aplicació massiva dels tests ràpids de detecció de l'EEB, a la Unió Europea són:

- a) La taxa de prevalença de l'EEB estava subestimada al conjunt de països de la UE. El nou sistema permet la detecció d'animals que no eren detectats per la vigilància epizootiològica passiva, basada en la detecció clínica de la malaltia.

Espanya (1,30 positius/100.000 bovins de més de 24 mesos) i la majoria de CA, entre aquestes, Catalunya (1,16), se situen molt a prop de la mitjana europea (1,39) i fins i tot per sota. Cal aprofundir, però, sobre el significat de taxes d'algunes CA com Balears (17,24), Múrcia (8,62), Navarra (8,62) i Galícia (3,27) que se situen molt per sobre de la mitjana dels països de la UE.

- b) La utilització de tests ràpids permetrà, en un futur proper, realitzar millors avaluacions comparatives del nivell de risc entre els diferents països que les obtingudes amb els programes de vigilància clínica. A més, possibilitarà un seguiment de l'evolució en el temps de l'epizoïtia.
- c) L'aplicació de tests de diagnòstic ràpid de l'EEB ha permès diferenciar les taxes d'incidència per categories d'animals segons la causa de la

Taula 15. Relació de tests positius en relació amb la població bovina adulta (>24 mesos) i cada una de les sub poblacions per països de la UE

País	Cens bovins > 24	Positius/100.000	Sospitosos Positius/Nre. tests	Risc Positius/Nre. tests	Sans Positius/Nre. tests
Espanya (sense Catalunya)	3.229.000	1,30	6/300 (2,00%)	15/9.517 (1,57‰)	21/93.662 (0,22‰)
Catalunya	171.000	1,16	0/0 (0,00%)	1/787 (1,27‰)	1/2.650 (0,45‰)
Regne Unit	5.300.000	4,67	235/483 (48,65%)	13/989 (13,14‰)	0/171 (0,00‰)
França	11.000.000	0,78	47/311 (15,11%)	14/16.203 (0,86‰)	25/801.844 (0,03‰)
Portugal	800.000	3,62	21/206 (10,19%)	8/1.891 (4,28‰)	0/3.798 (0,00‰)
Irlanda	3.400.000	1,58	49/231 (21,21%)	4/3.545 (1,12‰)	2/84.458 (0,02‰)
Bèlgica	1.500.000	1,00	3/128 (2,34%)	1/2.215 (0,45‰)	11/122.416 (0,09‰)
Dinamarca	900.000	0,11	1/48 (2,08%)	0/5.376 (0,00‰)	0/100.549 (0,00‰)
Alemanya	6.600.000	1,00	2/143 (1,39%)	46/114.840 (0,40‰)	18/868.541 (0,02‰)
Grecia	300.000	0,00	0/3 (0,00%)	0/404 (0,00‰)	0/4.717 (0,00‰)
Italia	3.400.000	0,44	0/3 (0,00%)	5/19.962 (0,25‰)	10/90.541 (0,11‰)
Luxemburg	100.000	0,00	0/12 (0,00%)	0/829 (0,00‰)	0/8.990 (0,00‰)
Holanda	1.800.000	0,44	2/67 (2,98%)	4/14.298 (0,27‰)	2/120.873 (0,01‰)
Àustria	1.000.000	0,00	0/0 (0,00%)	0/3.996 (0,00‰)	0/77.714 (0,00‰)
Finlàndia	400.000	0,00	0/1 (0,00%)	0/6.504 (0,00‰)	0/1.761 (0,00‰)
Suècia	700.000	0,00	0/5 (0,00%)	0/10.917 (0,00‰)	0/0 (0,00‰)
Total UE	40.800.000	1,39	366/1.941 (18,85%)	111/212.273 (0,52‰)	90/2.382.685 (0,03‰)

seva mort. Així, al conjunt dels països de la UE els resultats positius es concentren en les poblacions d'animals sospitosos i animals de risc, i són molt escassos entre els animals sans sacrificats per al consum humà.

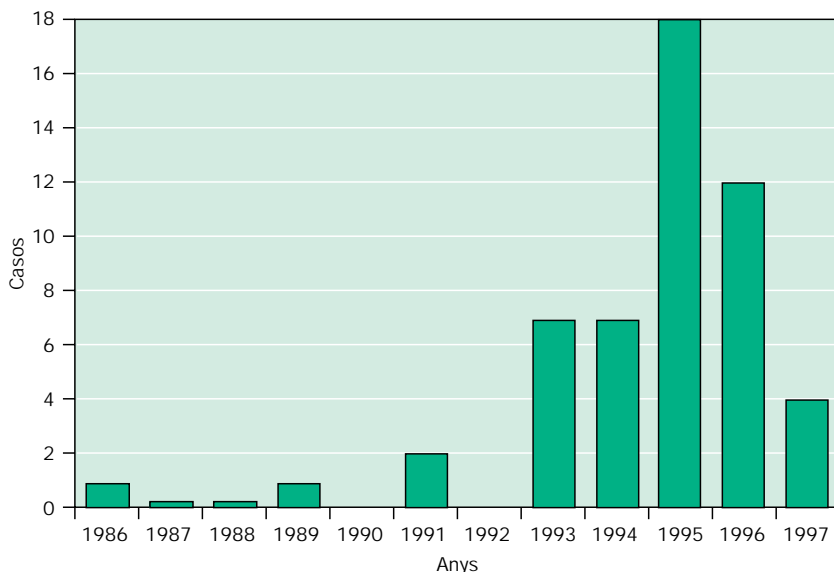
Crida l'atenció el fet que Espanya (0,22) i Catalunya (0,45) tinguin un nombre de positius per cada mil anàlisis fetes molt superior a la mitjana de la UE (0,03). Això indica que cal millorar i reavaluar, al nostre país, els criteris de classificació dels bovins, en cada una de les subpoblacions bovines a investigar. Seria convenient, en aquest sentit, implementar un programa de vigilància epizootiològica retrospectiva, seguint el model del Programa pilot de vigilància de França<sup>221</sup>. Aquest Programa ha permès concloure que en el 83% dels casos positius els animals havien tingut simptomatologia neurològica no característica de la malaltia. L'enquesta retrospectiva pot permetre redefinir els símptomes clínics de sospita, la qual cosa és molt important per a ramaders, veterinaris clínics i veterinaris oficials que treballen a la sanitat animal i a la salut pública.

- d) Sense menystenir la importància dels tests, caldria disposar d'un bon sistema de vigilància epizootiològica clínica per detectar els animals sospitosos amb símptomes neurològics.
- e) Per conèixer bé l'epizootiologia de la malaltia s'haurien d'aplicar tests ràpids a tots els animals morts en granges o durant el transport i no només a una petita mostra.
- f) Cal realitzar un estudi epizootiològic, en profunditat, sobre l'edat dels animals positius ja que permetrà conèixer el període de màxima exposició a l'agent infectiu. A Espanya, per exemple, la distribució dels animals positius, per any de naixement, es pot veure a la figura 13.

#### **4.1.2. Mecanismes de transmissió i susceptibilitat de l'hoste**

L'estudi epidemiològic dut a terme, l'any 1987, per Wilesmith, del Central Veterinary Laboratory de Weybridge<sup>152,153</sup>, conclou que les vaques s'han infectat en consumir restes ovines infectades de tremolor ovina. Aquestes restes s'han afegit a la dieta bovina, en forma de concentrats o farines, com un suplement ric en proteïna. Posteriorment, una soca d'un agent semblant al que provoca la tremolor ovina s'hauria adaptat a l'espècie bovina. A més, els resultats d'aquest estudi mostren que: a) no hi havia associació entre l'EEB i l'ús de productes farmacèutics o químics, com vacunes, esprais, antihelmíntics, herbicides, pesticides, etc.; b) l'agent de la tremolor ovina sembla ser el causant de l'EEB, però és important fer ressaltar que l'EEB no està relacionada directament amb la presència de tremolor ovina; c) l'EEB no sembla una malaltia d'origen genètic però no es pot excloure la susceptibilitat hereditària a la malaltia; d) el vehicle de

Figura 13. Distribució dels animals positius per any de naixement



transmissió de l'agent infeccios s'ha de trobar en els concentrats alimentaris d'origen animal que s'afegeixen a la dieta bovina; e) la diferència en el nombre de casos observats en granges de producció lletera o de carn s'explica pels diferents hàbits nutricionals en ambdós tipus d'explotació; f) l'epidèmia s'inicia a causa de l'augment en l'exposició del boví a una o més soques de l'agent de la tremolor ovina que haurien creuat la barrera entre espècies, i g) a causa d'un augment de l'exposició del boví a una soca de l'agent de la tremolor ovina adaptada a l'espècie bovina i que ja estava present en la població bovina des de feia temps. El reciclatge de restes bovines infectades dins la mateixa població bovina hauria amplificat l'epidèmia.

Per què la malaltia no es presenta abans dels anys 80? Durant el període 1972-1988, la producció de farines d'origen animal al Regne Unit per procés continu augmenta del 0 al 75%. Al mateix temps, l'ús de dissolvents en el procés d'extracció baixa durant el mateix període. Aquest ús de dissolvents consta de dues fases: una primera d'extracció (exposició al dissolvent orgànic durant moltes hores a 70 °C) i una segona d'eliminació del dissolvent mitjançant vapor (la calor humida és més efectiva per eliminar l'agent infeccios que la calor seca). A l'hivern de 1981-82 entra en vigor



una nova legislació que modifica el tractament tèrmic (disminució de la temperatura) i químic (supressió del tractament amb dissolvents i de vapor) a què eren sotmeses les restes animals dels escorxadors. La legislació es manté a Escòcia (això justificarà la menor incidència de l'EEB en aquest país). L'agent causant s'adapta a aquest tractament durant el període 1984-85. En aquest període s'observa un augment dels ovins aparellat amb un increment de la incidència de la tremolor ovina, i per tant una major presència de l'agent infectiu a les farines elaborades amb restes ovines.

La transmissió per via oral de la tremolor ovina a la vaca no ha pogut ser demostrada. Per tant, la teoria sobre l'origen de l'EEB es fonamenta en els treballs epidemiològics<sup>152,153</sup>. Els estudis immunoquímics han demostrat que la tremolor ovina, l'EEB i la vMCJ presenten un mateix patró proteic i que aquest és significativament diferent del de l'MCJ<sup>106</sup>.

La transmissió horitzontal, de bòvid a bòvid, de l'EEB no ha pogut ser demostrada. Actualment està en discussió la transmissió vertical ja que s'han donat casos d'EEB en vedells nascuts després de la prohibició al Regne Unit l'any 1988 de l'ús de farines d'origen animal per a l'alimentació de remugants<sup>222,223</sup>. Tanmateix, en els ovins sí que s'han demostrat ambdues vies de transmissió.

Els estudis de transmissió experimental exigeixen condicions molt especials: gran quantitat d'agent infectiu; combinació de dues vies (intracerebral i oral); llarg període d'incubació; susceptibilitat individual de l'animal. Existeix el que es coneix com a barrera d'espècie, és a dir, diferències entre espècies i variacions en la seqüència del gen de cada espècie. La barrera d'espècie no és constant, varia entre diferents espècies i malalties diverses<sup>106</sup>. Genèticament la barrera resideix en la seqüència aminoacídica de la PrP: com més s'assembla la seqüència d'aminoàcids de la molècula de la PrP anormal a la seqüència de la PrP normal de l'hoste, més gran serà la probabilitat que aquest adquireixi la malaltia. Aquesta diferència en el cas del prió de la vaca i de l'ovella afecta 7 codons, en el cas de la vaca i l'home la diferència puja a 30 codons, mentre que entre ratolí i hámster és de 16 codons. La diferència entre prions d'una i altra espècie configura així la barrera d'espècie que fa altament improbable el contagi. Però no sabem si el més important és la diferència quantitativa (el nombre de codons que presenten diferències entre un prió i l'altre) o la diferència qualitativa (el lloc on es trobi la diferència). La intensitat en què el prió aconsegueix travessar les barreres de les espècies depèn de diferents factors com la soca del prió, la seva dosi, la genètica del receptor i la via d'introducció<sup>224</sup>.

Fins ara s'ha aconseguit infectar experimentalment un gran nombre de mamífers a partir de la vaca<sup>225</sup>. Tanmateix, la quantitat necessària per

contagiar un animal d'una altra espècie pot ser entre 10 i 10<sup>4</sup> vegades la quantitat necessària per contagiar un animal de la mateixa espècie<sup>106</sup>. Així s'ha aconseguit infectar: a) vaca<sup>225</sup>, per via intracerebral i intravenosa amb períodes d'incubació de 500 a 650 dies; b) porc<sup>160</sup>, ovella<sup>226</sup>, cabra i visó, per via intracerebral i oral en condicions extremes; c) ratolí, per via intracerebral combinada amb intraperitoneal amb 300 dies d'incubació, i d) tití comú (*Callithrix jacchus*). El conill és un animal especialment resistent. Les anàlisis comparatives de les seqüències de la PrP d'animals susceptibles a la infecció i del conill identifiquen diferències particulars en els aminoàcids del cos central de la PrP d'aquest lagomor<sup>f227</sup>.

#### 4.1.2.1. Infectivitat dels teixits bovins

Des de l'aparició de l'EEB s'han estat realitzant múltiples treballs experimentals per determinar la infectivitat dels teixits bovins. Aquesta infectivitat sembla reduïda al teixit nerviós, especialment a l'encèfal i als teixits relacionats (meninges, hipòfisi), la medul·la espinal, els ganglis raquidis i cranials, i la retina, així com al teixit limfoide associat al tub digestiu<sup>228,229</sup>.

Middleton i Barlow<sup>230</sup> no van detectar infectivitat en alimentar ratolins amb llet i glàndula mamària, melsa, placenta, node limfàtic supramamari, carcassa i nodes limfàtics perifèrics, de vaques diagnosticades d'EEB.

Treballs posteriors<sup>231,232</sup> van demostrar, mitjançant inoculació parenteral en ratolins de teixits de vaques afectades d'EEB l'absència d'infectivitat en: sang, medul·la òssia, LCR, greix, pell, tub digestiu (esòfag, rumen, reticle, llibret, quall, intestí prim, còlon i recte), cor, ronyó, fetge, pàncrees, tràquea, pulmó, nòdes limfàtics (mesentèric, prefemoral, retrofaríngic), melsa, tonsil·la, musculatura esquelètica (múscul semitendinos, diafragma, múscul *longissimus*, múscul masseter), aparell reproductor femení (llet, ovari, placenta, úter) i masculí (testicle, epidídim, pròstata, vesícula seminal, semen) i nervis de la cauda equina i perifèrics (nervi ciàtic, nervi tibial i plexe esplènic).

Els comitès de vigilància de l'EEB, inicialment al Regne Unit, i posteriorment a la UE, basant-se en els resultats obtinguts en els diferents estudis d'infecció experimental realitzats en ratolins infectats intracranialment (per aquesta via la dosi infectiva ha de ser 125.000 vegades menor que per la via digestiva segons experiments realitzats amb ovelles amb tremolor) i determinant el grau d'infecciositat, han establert una classificació sobre la infectivitat de l'EEB que inclou 4 categories:

*Categoria I o d'alta infectivitat*: encèfal, medul·la espinal, ganglis raquidis i cranials, i ulls.

*Categoria II o d'infectivitat mitjana*: teixit limfoide associat a l'intestí, melsa, tonsil·les, líquid cefaloraquidi, meninges, hipòfisi i adrenals.

*Categoria III o de baixa infectivitat:* còlon distal, mucosa nasal, nervis perifèrics, medul·la òssia, fetge, pulmó, pàncrees i tim.

*Categoria IV o sense infectivitat detectable:* sang, sèrum, bilis, femtes, orina, cor, ronyó, glàndula mamària, llet, ovari, úter i teixit fetal, testicle, vesícula seminal, musculatura esquelètica, tiroides, saliva, glàndules salivals, os, cartílag, teixit conjuntiu, pèl i pell.

Aquesta llista seria revisable segons els resultats obtinguts en les proves experimentals.

## 4.2. Epidemiologia de les EET en els humans

La connexió entre el *kuru*<sup>233,234</sup> i la tremolor ovina, basada en el fet que les seves característiques epidemiològiques, clíniques i anatomopatològiques són similars<sup>235</sup>, va portar a la comprovació que, a l'igual de la tremolor ovina<sup>236</sup>, el *kuru*<sup>237</sup> i l'MCJ<sup>238</sup> són malalties transmissibles experimentalment. Des de llavors els sistemes de vigilància epidemiològica tracten d'identificar el mecanisme de transmissió natural de les EET humanes, però estan limitats en gran mesura pel període d'incubació tan prolongat<sup>239,240</sup> i per la baixa incidència<sup>197,241</sup> d'aquestes malalties.

La informació acumulada al llarg de més de tres dècades no indica que existeixi una font d'infecció ambiental i exclou la transmissió interhumana a la gran majoria dels casos<sup>242</sup>. La forma més freqüent d'EET humana és, per tant, l'espòradica, en què no s'ha pogut identificar el mecanisme que provoca l'aparició del prió causant de la malaltia i es proposa que aquest s'ha generat de forma espontània per una mutació al *PRNP* d'una cèl·lula somàtica o per un canvi en la conformació de la PrP<sup>C</sup> ja formada<sup>243</sup>. L'explicació de les troballes positives proporcionades per la investigació epidemiològica ha depès de diferents factors. La genètica molecular va demostrar que la incidència més gran d'EET en algunes comunitats geogràfiques o ètnies és deguda a un excés de casos de mutacions al gen de la PrP<sup>244,245</sup>. La detecció de signes d'alarma epidemiològica, com l'edat jove dels primers casos d'EET en receptors d'hormona del creixement<sup>246</sup> i implantacions de duramàter<sup>247</sup> d'origen humà, seguida de la monitorització exhaustiva de les cohorts exposades, van permetre identificar els principals factors de risc per a l'MCJ iatrogènica<sup>202</sup>. En el cas de la variant de l'MCJ van ser l'edat jove a l'inici de la malaltia<sup>248,249</sup> juntament amb un perfil clínic i neuropatològic nou<sup>174</sup> els fets que van conduir a identificar-la.

### 4.2.1. Epidemiologia descriptiva de les EET en els humans

La investigació de laboratori havia demostrat que l'MCJ era transmissible experimentalment<sup>238</sup>, en conseqüència la investigació epidemiològica tenia com a objectiu desvetllar el mecanisme de transmissió natural.

#### 4.2.1.1. Distribució geogràfica

S'han notificat casos d'MCJ en un gran nombre de països<sup>197</sup> encara que la vigilància epidemiològica, sistemàtica i durant períodes de temps prolongats, s'ha realitzat només en uns quants<sup>250,251</sup>.

L'anàlisi de la distribució geogràfica dels casos de l'MCJ pot aportar informació molt valuosa, ja que la detecció d'agrupacions geogràfiques de casos recolzaria l'existència d'una font d'infecció ambiental o la transmissió horitzontal de la malaltia.

Als Estats Units d'Amèrica, malgrat les considerables diferències en la taxa de mortalitat mitjana per l'MCJ entre els diferents estats, no semblava que existís cap agrupació òbvia de casos i una anàlisi més exhaustiva en la recerca d'agrupacions temporoespacials a l'àrea urbana de Boston tampoc no les va detectar<sup>197</sup>.

Malgrat tot, en certes comunitats el nombre de casos de l'MCJ identificats és superior a l'esperat. Una de les primeres descripcions d'agrupacions geogràfiques de casos procedeix d'un estudi epidemiològic a escala nacional a Anglaterra i Gal·les, en què es va observar que alguns casos es trobaven relacionats per la proximitat geogràfica en àrees amb una densitat de població baixa<sup>252</sup>. La prolongació del període d'estudi va permetre comprovar que, malgrat que existien diferències en la taxa de mortalitat per l'MCJ entre els diferents territoris, aquestes diferències no guardaven relació amb la densitat de població<sup>253</sup>, no es mantenien al llarg del temps i la distribució espacial i temporal dels casos semblava seguir un patró aleatori<sup>254</sup>.

Un estudi epidemiològic amb base poblacional va mostrar una associació positiva entre l'MCJ i la densitat de població a França, amb una taxa d'incidència a la ciutat de París superior a la de la seva àrea metropolitana i a la taxa mitjana nacional<sup>250</sup>; l'anàlisi formal va confirmar que els casos detectats a la ciutat de París durant el període d'estudi constituïen una agrupació espacial<sup>255</sup>. Malgrat tot, la relació entre la incidència de l'MCJ i la densitat de població semblava dependre més del fet que en determinades zones no es detectaven casos que no pas d'un excés de casos en altres. La importància del biaix en el diagnòstic i la notificació de casos es va posar de manifest en un estudi recent, que va mostrar que l'increment en les tendències de mortalitat per l'MCJ a França al llarg del temps es produïa especialment en aquells territoris on prèviament no s'havien identificat casos o el nombre de casos havia estat significativament inferior a la mitjana nacional<sup>256</sup>.

Per tant, una agrupació de casos no demostra l'existència d'una font d'infecció ambiental o la transmissió horitzontal de l'MCJ, i aquest fenò-

men pot ser conseqüència simplement de l'atzar o d'un biaix en la identificació dels casos, en relació amb el major desenvolupament dels serveis mèdics o l'atenció que es dona a la malaltia. Tot indica que l'MCJ esporàdica existeix a tot el món i que la seva incidència no està relacionada amb factors climàtics, culturals o econòmics.

Mereixen una atenció especial les agrupacions ètniques o geogràfiques de casos observats a Israel –amb una incidència de l'MCJ entre els jueus procedents de Líbia cent vegades superior a la de la resta de la població<sup>257</sup>–, a Eslovàquia –on es va identificar un nombre elevat de casos en una petita comunitat rural<sup>258</sup>– i a Xile<sup>259</sup>. L'elevada proporció de casos amb una agregació familiar va ser evident des de l'inici a Xile. Aquest component hereditari no es va observar inicialment en altres països, encara que més tard es va apreciar que un nombre important de casos a Israel estaven agrupats en famílies<sup>260</sup> i que a la zona rural d'Eslovàquia l'índex de consanguinitat era molt alt<sup>261</sup>. La confirmació que la predisposició a patir la malaltia en els membres d'aquestes comunitats ètniques o geogràfiques estava determinada genèticament es va obtenir gràcies als avenços en biologia molecular<sup>73</sup>; així es va comprovar que l'aparició de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob s'associava a la presència d'una mutació al codó 200 del gen de la PrP en les persones afectades pertanyents a aquestes comunitats a Eslovàquia<sup>244</sup>, Israel<sup>245,262</sup> i Xile<sup>263</sup>.

La gran majoria dels casos de l'MCJ iatrogènica han estat identificats a França i al Japó, on van aparèixer més de la meitat dels casos relacionats amb el tractament amb l'hormona del creixement d'origen hipofític i amb implantacions de duramàter respectivament; a la resta de països, exceptuant el Regne Unit i els Estats Units, el nombre total de casos és inferior a 10<sup>202</sup>.

Pel que fa al *kuru*, es va limitar a una petita zona de muntanya al sud de les terres altes orientals de Papua Nova Guinea, amb una població total de 35.000 persones. La malaltia va aparèixer en tots els poblats habitats per nadius de la comunitat lingüística i cultural *fore* i també a les comunitats pròximes amb què van establir relacions familiars<sup>233,239</sup>.

La vMCJ s'ha notificat exclusivament, fins al moment, a tres països europeus: el Regne Unit<sup>174</sup>, França<sup>264</sup> i Irlanda. L'anàlisi de la distribució geogràfica dels primers 84 casos ha confirmat l'existència d'una agrupació geogràfica de casos al comtat de Leicester i mostra que la incidència acumulada de la malaltia és més gran al nord de Gran Bretanya que al sud<sup>265</sup>, troballa per a la qual no hi ha de moment una explicació satisfactòria, encara que no sembla que sigui conseqüència d'un biaix en la identificació dels casos.

#### 4.2.1.2. Incidència

En comparar la incidència de les EET humanes observades en els diferents estudis epidemiològics s'ha de considerar, en primer lloc, que els criteris diagnòstics utilitzats per a la definició dels casos han anat canviant al llarg del temps<sup>197,198,266</sup>; aquests canvis han estat conseqüència dels avenços en el diagnòstic de la malaltia, de manera que avui dia es disposa d'eines que ofereixen una precisió diagnòstica elevada<sup>196,202</sup> i que han estat incorporades a l'última actualització de criteris diagnòstics (vegeu «Criteris de definició de cas. Diagnòstic de les EET en els humans»).

Com s'ha comentat anteriorment, la major atenció prestada a la malaltia i el desenvolupament dels serveis mèdics i de vigilància epidemiològica determinen un increment en la identificació de casos; així s'ha observat un aparent augment en la incidència al llarg del temps en aquells països en què s'ha realitzat una vigilància epidemiològica durant períodes prolongats, que probablement reflecteix una millora en la identificació de casos (taula 16).

Les EET humanes són malalties molt poc freqüents; clàssicament, s'ha considerat que la seva incidència se situa al voltant d'1 cas (definitiu o probable) per milió d'habitants i any, estimació basada en els resultats

Taula 16. Incidència de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob en diferents països\*

País	Incidència anual/milió d'habitants
Alemanya	
1979-1990	0,31
1993-1994	0,68
Xile	
1955-1972	0,10
1973-1977	0,31
1978-1983	0,69
Estats Units d'Amèrica	
1973-1977	0,26
1986-1988	0,83
França	
1968-1977	0,34
1978-1982	0,58
1992-1994	0,81
1995-1997	1,19**

\*Taula adaptada de Cousens et al<sup>251</sup>.

\*\*MCJ esporàdica<sup>256</sup>.

de diferents estudis epidemiològics que mostraven xifres properes a 0,5 casos per milió d'habitants i any i d'algunes zones amb taxes d'incidència clarament superiors. A causa de la curta durada de la malaltia a la majoria dels casos, les taxes d'incidència i de mortalitat es poden considerar equivalents i s'utilitzen indistintament a la majoria d'estudis.

L'estudi epidemiològic més exhaustiu en què es va dur a terme una vigilància sistemàtica de l'MCJ es va realitzar en 6 països europeus durant el període comprès de 1993 a 1995<sup>241</sup>. La taxa de mortalitat anual mitjana durant el període d'estudi va ser de 0,71 casos per milió d'habitants i any, i va destacar la consistència en les taxes de mortalitat entre els diferents països i al llarg del temps.

En el punt àlgid d'incidència del *kuru*, la taxa de mortalitat anual de la malaltia va ser de l'1%; en alguns clans es va situar entre el 5% i el 10% i va suposar el 50% de totes les morts<sup>233,234</sup>. Un cop eliminat el canibalisme ritual, la incidència del *kuru* va anar disminuint progressivament i actualment es considera una malaltia virtualment eradicada.

En el cas de la vMCJ, l'anàlisi més recent, que inclou els primers 75 casos del Regne Unit, ha mostrat que durant el període 1994-2000 l'increment anual de la incidència ha estat del 23% i el de la mortalitat del 33%<sup>267</sup>.

#### 4.2.1.3. Edat i sexe

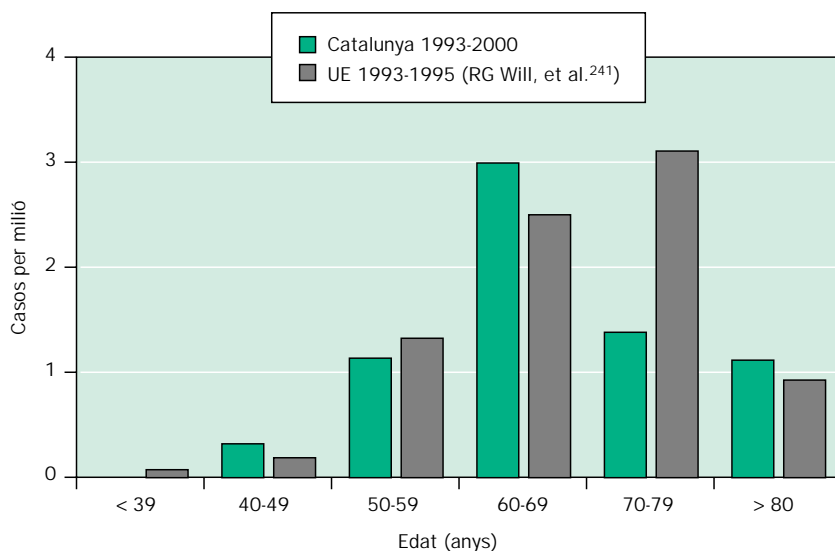
L'MCJ esporàdica és molt poc freqüent per sota dels 50 anys, i les taxes de mortalitat específiques per edat més altes se situen entre els 60 i 79 anys (figura 14). En alguns estudis s'ha observat un lleuger predomini en dones per al qual no existeix una explicació satisfactòria<sup>250,268</sup>.

Les EET familiars apareixen en edats relativament més precoces; l'edat mitjana d'inici és de 51 anys en l'insomni letal familiar<sup>269</sup> i de 55 anys en l'MCJ associada a la mutació al codó 200 del gen de la PrP<sup>11</sup>. L'herència d'aquestes malalties és autosòmica dominant, per això la freqüència és similar en ambdós sexes.

L'edat a l'inici de l'MCJ iatrogènica també és inferior a la de l'MCJ esporàdica. En els casos relacionats amb implantacions de duramàter l'edat mitjana va ser de 53 anys<sup>270</sup>; i en els casos secundaris de tractament amb l'hormona del creixement d'origen humà, de 20, amb límits de 9 i 26 anys<sup>205</sup>.

El *kuru* va afectar persones de totes les edats des de la infància; l'edat del malalt més jove va ser de 4 anys, que correspon al període mínim d'incubació de la malaltia. A l'edat prepuberal i l'adolescència, la freqüència en ambdós sexes va ser similar. En adults, entre els quals va aparèixer el 60% dels casos, es va produir un predomini clar (14:1) en dones<sup>233</sup>, i en

Figura 14. MCJ esporàdica: mortalitat específica per edat



el moment de màxima incidència de la malaltia el 90% de les morts en les dones adultes van ser degudes al *kuru*<sup>197</sup>.

L'edat a l'inici de la malaltia en la vMCJ és de 26 anys (mitjana), amb uns límits de 12 a 74 anys<sup>265</sup>. Els casos estan distribuïts per igual entre ambdós sexes.

#### 4.2.1.4. Factors de risc

Des dels primers estudis epidemiològics fins a la identificació de la variant de l'MCJ, les característiques epidemiològiques de les EET humanes havien romàs relativament inalterables. De manera constant s'observava que entre el 5 i el 15% dels casos apareixien agrupats en famílies en què semblava que existís un patró d'herència autosòmic dominant; en un petit percentatge de casos es podia identificar un factor de risc rellevant, l'antecedent d'un procediment mèdic o quirúrgic capaç de transmetre la malaltia; tanmateix, a la gran majoria dels casos no se'n podia explicar l'origen<sup>197</sup>. En un estudi europeu recent, es pot comprovar que aquestes característiques són completament vàlides avui en dia; s'hi han identificat 575 casos definitius o probables de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob, distribuïts entre les diferents categories diagnòstiques de la forma següent: 498 casos esporàdics (87%), 47 casos familiars (8%) i 30 casos iatrogènics (5%)<sup>241</sup>.



## Antecedents familiars

L'agregació familiar de l'MCJ va fer plantejar inicialment la possibilitat de transmissió de persona a persona per contacte. Aquesta hipòtesi no explicava per què la malaltia apareixia en membres de les famílies afectades que vivien en països diferents i entre els quals mai no havia existit contacte. Els avenços en genètica molecular han permès comprovar que, malgrat existir un contacte interpersonal estret entre els components de les famílies, la malaltia només apareixia en aquells que tenien una mutació al gen de la PrP; per tant, l'origen de la malaltia en els casos familiars és degut a un mecanisme genètic i no a causes ambientals<sup>77</sup>.

## Transmissió iatrogènica

La transmissió iatrogènica de l'MCJ ha estat conseqüència de la inoculació, directament en el sistema nerviós central, a prop d'aquest o per via perifèrica, de material contaminat per prions<sup>202,271</sup>. Des de la primera transmissió accidental per mitjà d'un trasplantament de còrnia<sup>272</sup>, s'han identificat fins a 267 casos de malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica<sup>202</sup>. Les causes n'han estat la utilització d'elèctrodes intracerebrals d'electroencefalografia estereoatàxica<sup>273</sup> o instrumental neuroquirúrgic<sup>274</sup> contaminats, i fonamentalment les implantacions de duramàter<sup>275</sup> i el tractament amb hormones hipofítiques<sup>276,277</sup> d'origen humà.

Les principals diferències entre els diferents factors de risc s'observen en relació amb la via d'entrada del prió (taula 17). Quan aquesta es produeix directament en el sistema nerviós central o s'accedeix a aquest mitjançant el nervi òptic, el període d'incubació es mesura en mesos i la síndrome clínica predominant és la demència; d'altra banda, quan el prió s'inocula per una via perifèrica o es diposita en la superfície cerebral, el període d'incubació es mesura en anys i la síndrome clínica que predomi-

Taula 17. Casos de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica\*

Mecanisme d'infecció	Nombre de pacients	Entrada de l'agent al cervell	Període d'incubació mitjana (límits)	Quadre clínic inicial
Trasplantament de còrnia	3	Nervi òptic	16, 18, 320 mesos	Demència/Cerebel·lós
EEG estereoatàxic	2	Intracerebral	18 mesos (16-20)	Demència/Cerebel·lós
Neurocirurgia	5	Intracerebral	17 mesos (12-28)	Visual/Demència/Cerebel·lós
Implantació de duramàter	114	Superfície cerebral	6 anys (1,5-18)	Cerebel·lós (Visual/Demència)
Hormona del creixement	139	Hematògena (?)	12 anys (5-30)	Cerebel·lós
Gonadotropina	4	Hematògena (?)	13 anys (12-16)	Cerebel·lós

\*Taula adaptada de Brown P<sup>202</sup>.

na és l'atàxia cerebel·losa<sup>202</sup>. Aquestes diferències clíniques recolzen la hipòtesi que en l'MCJ esporàdica el prió s'origina de manera espontània dins del sistema nerviós central.

### **Altres procediments mèdics o quirúrgics**

La relació causal entre una intervenció quirúrgica o un tractament mèdic i l'MCJ s'accepta únicament per a les intervencions detallades anteriorment.

Avaluar el risc de transmissió de l'EET mitjançant una exposició determinada és complicat perquè el període d'incubació de la malaltia és molt llarg i no existeix cap criteri que diferenciï de manera definitiva l'MCJ esporàdica de l'MCJ iatrogènica; no obstant això, es pot obtenir informació valuosa en comparar la freqüència de l'exposició en casos d'EET amb la de controls. Els estudis de casos i controls realitzats fins a la data no han permès identificar un factor de risc per a l'MCJ que aparegui associat a aquesta de manera consistent<sup>278-282</sup>; i en una metaanàlisi, que inclou les dades d'algun dels estudis anteriors, les úniques associacions estadísticament significatives ho van ser amb antecedents familiars de la malaltia d'MCJ i amb trastorn psicòtic previ<sup>283</sup>. S'ha trobat associació, almenys, en dues ocasions, amb intervencions quirúrgiques<sup>278,282</sup> i traumatismes<sup>278,279</sup>. Malgrat això, aquest disseny d'estudi està subjecte a diferents tipus de biaix i limitat en gran mesura per la baixa incidència de la malaltia i per la necessitat d'obtenir la informació referent als possibles factors de risc en els pacients mitjançant informadors indirectes.

### **Transfusions de sang i hemoderivats**

No s'ha identificat cap cas d'EET humana transmès per la sang, i quan s'ha postulat que l'origen de la malaltia podia trobar-se en una transfusió sanguínia s'ha fet d'una manera purament especulativa<sup>284-286</sup>.

No s'ha trobat un increment del risc d'EET després de les transfusions sanguínies als estudis de casos i controls<sup>278-282,287</sup> ni a les metaanàlisis<sup>283,288</sup>.

L'anàlisi de les característiques clíniques pot ser de gran utilitat a l'hora d'avaluar el possible risc de transmissió de la malaltia mitjançant les transfusions sanguínies. Les EET transmises per les transfusions sanguínies s'haurien d'assemblar a les EET transmises per inoculació perifèrica. El *kuru*<sup>233</sup>, l'MCJ iatrogènica per tractament amb hormones hipofítiques de cadàver<sup>205</sup> i la variant de l'MCJ<sup>202</sup> tenen un quadre clínic diferent de l'MCJ esporàdica perquè a l'inici de la malaltia predomina la síndrome cerebel·losa progressiva sobre el deteriorament cognitiu. A l'únic estudi en què es va analitzar aquest aspecte es va observar que les característi-

ques clíniques de 21 pacients amb l'antecedent de transfusió sanguínia eren similars a les de l'MCJ esporàdica i clarament diferents de les de l'MCJ en 20 receptors d'hormona humana del creixement<sup>287</sup>.

Malgrat tot això, només mitjançant el seguiment de cada unitat de sang donada per un pacient amb EET es pot descartar la possibilitat de transmissió de la malaltia per mitjà de les transfusions sanguínies. Diversos estudis han analitzat retrospectivament aquest aspecte. El primer estudi no troba un augment de la incidència de la malaltia a les poblacions en què residien 6 pacients que van realitzar més de 10 donacions<sup>287</sup>. El segon estudi comprova que cap dels 27 pacients que van rebre unitats de sang donades per un pacient que va morir d'MCJ va desenvolupar una malaltia neurològica, després de períodes de seguiment que van oscil·lar entre 1 i 20 anys<sup>289</sup>. Per acabar, un tercer estudi mostra que l'MCJ no sembla haver ocorregut de manera inadvertida en un col·lectiu molt exposat a productes derivats de la sang com és el dels hemofílics, en el qual no s'ha comunicat cap cas de la malaltia<sup>290</sup>.

Tot i que les dades epidemiològiques indiquen que les transfusions de sang no semblen ser un factor de risc d'EET, no permeten excloure que excepcionalment hagin pogut transmetre l'agent i originat algun cas aïllat d'EET<sup>291</sup>.

## Dieta

L'origen del *kuru* es troba probablement en l'aparició d'un cas esporàdic de l'MCJ entre els membres de la comunitat cultural i lingüística *fore*. L'extensió de l'epidèmia es deu a les pràctiques rituals de canibalisme pròpies de la comunitat, durant les quals el nucli familiar menjaven cadàvers dels morts com a mostra de respecte i de dol. Amb l'eliminació dels rituals de canibalisme, la malaltia va anar desapareixent de forma esglaonada entre els diferents grups d'edat; inicialment va desaparèixer en la infància, posteriorment en adolescents i més tard en adults joves<sup>239</sup>. No ha aparegut cap cas de *kuru* en persones nascudes després de l'eliminació del canibalisme el 1956<sup>11</sup>; ni específicament en els fills d'aquelles dones que van desenvolupar la malaltia amb posterioritat, la qual cosa indica que la transmissió vertical no intervé en l'aparició de la malaltia<sup>197</sup>. La peculiar distribució per edat i sexe apunta al fet que la via alimentària<sup>292</sup>, malgrat ser poc eficaç<sup>293</sup>, és la responsable de la transmissió a la gran majoria dels casos, ja que eren les dones i els nens els que consumien preferentment el cervell i les vísceres; encara que no es pot excloure que l'exposició intradèrmica i en mucoses pogués constituir causa de transmissió durant la preparació del cadàver per al ritual.

La hipòtesi que la causa de l'MCJ era l'exposició per via alimentària a l'agent de la tremolor ovina es va veure reforçada inicialment per la in-

cidència elevada de la malaltia en algunes comunitats amb hàbits culinaris específics, que incloïen el consum de cervell i ulls d'ovelles i cabres<sup>294</sup>; malgrat això, aquesta hipòtesi va començar a perdre força quan es va comprovar que l'aparició de la malaltia en aquests grups s'associava a la presència d'una mutació al codó 200 del gen de la PrP en les persones afectades<sup>245,262</sup>. La distribució geogràfica mundial de l'MCJ és un altre argument poderós en contra de la relació etiològica amb la tremolor ovina; la incidència de l'MCJ en països com el Regne Unit i França, on la tremolor ovina és endèmica, era similar a la de països com Austràlia i Nova Zelanda, on la tremolor ovina havia estat eradicada<sup>197</sup>.

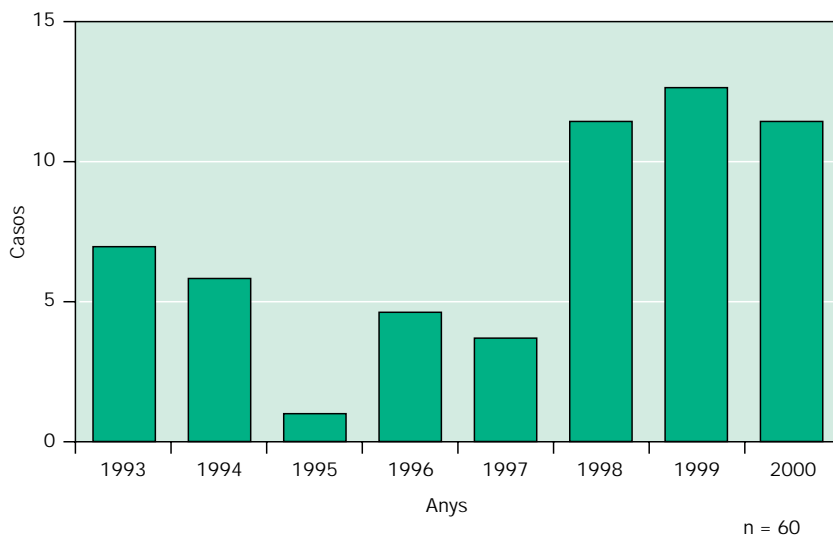
Quan va emergir l'epidèmia d'EEB al Regne Unit, la informació derivada dels estudis epidemiològics indicava que l'exposició alimentària a l'agent de la tremolor ovina no era un factor de risc per a l'MCJ i, per tant, es va assumir que la nova malaltia bovina no suposava cap risc per a la salut humana<sup>295</sup>. Malgrat això, es va recomanar, entre altres mesures, posar en marxa de nou el sistema de vigilància epidemiològica de l'MCJ al Regne Unit gràcies al qual es va obtenir un coneixement amb detall de les característiques clíniques, epidemiològiques i neuropatològiques de les EET humanes, que va fer possible identificar amb rapidesa l'aparició de deu casos d'una nova EET humana, la vMCJ<sup>174</sup>. La creació de sistemes de vigilància epidemiològica similars en altres països de la Unió Europea va permetre comprovar que la nova malaltia es trobava limitada al Regne Unit; per tant, la coincidència temporal i geogràfica amb l'EEB va portar a plantejar com a hipòtesi més probable que aquesta era l'origen de la vMCJ. Els avenços en biologia molecular han permès confirmar aquesta hipòtesi<sup>296-298</sup>. Encara que no existeix una evidència directa, la via de transmissió més plausible és la via alimentària.

#### 4.2.1.5. Situació a Catalunya

El registre d'EET humanes a Catalunya inclou els casos definitius i probables<sup>198</sup> identificats des de 1993. Durant el període 1993-2000 s'han identificat 60 casos (figura 15), que indiquen una incidència anual mitjana d'1,25 casos per milió d'habitants i any. Un cas està catalogat com a MCJ iatrogènica, ja que va aparèixer en una persona amb l'antecedent d'una implantació de duramàter; en els 6 dels 7 casos d'EET d'origen genètic es va identificar una mutació al gen de la PrP, i els 52 casos restants van ser diagnosticats com a MCJ esporàdica. No s'ha identificat cap cas de vMCJ. La confirmació del diagnòstic per mitjà d'un estudi neuropatològic es va obtenir en el 60% dels casos d'MCJ esporàdica.

A continuació, les característiques clíniques i epidemiològiques dels casos d'MCJ esporàdica fan referència als 42 casos que haguessin pogut

Figura 15. Evolució de les EET humanes a Catalunya (casos confirmats i probables)



ser diagnosticats basant-se en els criteris vigents fins a 1998<sup>266</sup>; l'exclusió dels 10 casos en els quals el diagnòstic s'estableix exclusivament per mitjà del quadre clínic i la detecció de la proteïna 14-3-3 a l'LCR permeten establir comparacions amb altres estudis. La mitjana d'edat a l'inici de la malaltia se situa en 64 anys, amb uns límits entre 44 i 85 anys, la proporció dona:home és 3:2 i la mitjana de duració de 3 mesos (entre 1 i 24). La taxa de mortalitat específica per edat també té una distribució molt similar a l'observada en altres estudis<sup>241</sup>, encara que el nombre de casos identificats en el grup d'edat comprès entre 70 i 79 anys sigui inferior a l'esperat (figura 14).

#### 4.2.2. Mecanismes de transmissió i susceptibilitat de l'hoste

En la transmissió de les EET influeixen de manera molt important l'infectivitat del material contaminat, la via d'inoculació i la susceptibilitat genètica:

##### 4.2.2.1. Infectivitat del material contaminat

Depèn dels factors següents:

#### Font

S'han d'excloure de les donacions de material biològic els pacients que puguin ser origen d'una contaminació potencial (taula 18). Lògicament, el

## Taula 18. Persones que poden originar una contaminació

- Casos coneguts o sospitosos d'EET
- Receptors d'hormones hipofítiques humanes, com ara hormona del creixement o gonadotropina\*
- Receptors d'implantacions de duramàter
- Receptors de trasplantaments corneals
- Membres de famílies amb EET familiar identificada

\*L'any 1985 es va retirar l'hormona del creixement d'origen humà i actualment s'obté per recombinació del DNA.

risc de contaminació del material serà més gran quan el material provingui d'un grup ampli de donants.

### **Teixit**

La classificació dels teixits segons la seva infectivitat (vegeu l'apartat 4.1.2, «Infectivitat dels teixits bovins»), deriva dels principals estudis experimentals amb l'agent de la tremolor ovina<sup>140</sup>.

### **Dosi**

La dosi inoculada de l'agent dependrà del volum de material inoculat i del nombre d'inoculacions. Així doncs, en el cas de l'hormona del creixement la possibilitat de contraure l'MCJ està en relació principalment amb el temps total de tractament<sup>271</sup>. Per a un volum determinat, la dosi se suposa menor en el cas dels productes que deriven d'un grup extens de donants. El concepte de «llindar d'infectivitat» implica que la transmissió ocorre únicament quan el nivell d'infectivitat en el material contaminat supera aquest llindar<sup>299</sup>.

### **Soca**

L'agent de la vMCJ és distint de l'agent de l'MCJ clàssica i indistingible de l'agent de l'EEB<sup>296-298</sup>. La transmissibilitat de l'agent de l'EEB s'ha demostrat amb cervell, medul·la espinal i retina dels animals afectats de manera natural, i a l'ili distal dels infectats experimentalment. No s'ha trobat infectivitat de l'EEB a la melsa, les amígdals, els ganglis limfàtics i els leucòcits. Una investigació recent suggereix que la patogènia de la vMCJ és distinta de la de l'MCJ clàssica pel fet que podria afectar en gran manera el teixit limforeticular<sup>300-303</sup>, incloent-hi possiblement els limfòcits circulants.

### **Descontaminació**

Els mètodes més efectius per a la descontaminació d'aquests agents no són aplicables al procés de purificació dels derivats plasmàtics<sup>304</sup>.

#### 4.2.2.2. Via d'inoculació

La transmissió és molt més efectiva quan el material contaminat es diposita directament a l'SNC o a prop d'aquest<sup>168</sup>.

#### 4.2.2.3. Susceptibilitat genètica a les EET

Determinats genotips confereixen una susceptibilitat més gran a la infecció<sup>168,305</sup>.

Un dels polimorfismes més freqüents a la població caucasiana és el que presenta el codó 129 de la proteïna prionica. Existeixen dos al·lels a la població sana, que es diferencien per la presència d'una metionina o una valina en el residu 129 de la PrP. Per aquest fet, i perquè tots els individus són portadors de dos al·lels de cada gen –heretats de pare i mare–, trobem a la nostra població el genotip MM en el 43% d'individus, un 42% que són MV i tan sols un 15% que són portadors del genotip VV. Parlem de genotip homozigot quan el dos al·lels són idèntics (MM i VV) i correspon al 58% de la població en contraposició a l'heterozigot MV que constitueix el 42% restant. Aquests polimorfismes són altament freqüents en la població sana i no són responsables que es desenvolupi cap de les patologies descrites. Malgrat això, s'ha detectat que un 85% dels pacients que pateixen la forma esporàdica de l'MCJ són homozigots pel codó 129 enfront del 58% detectat en la població normal. Un altre fet que cal destacar és que en els casos d'MCJ iatrogènica associada a l'administració d'hormona de creixement, el 50% dels pacients són VV enfront del 15% de la població sana. Finalment, tots els casos testats de la vMCJ són portadors del genotip MM al codó 129. Per aquests motius, es considera que el genotip heterozigot MV pot conferir certa protecció en el desenvolupament de la malaltia i, per contra, parlem que existeix un cert grau de susceptibilitat genètica a partir de la forma esporàdica de l'MCJ pel fet de ser homozigot al codó 129.

Es desconeix si els individus que són MV o VV gaudeixen d'una protecció genètica a partir de la vMCJ o s'ha produït un retard en el seu desenvolupament. Probablement, en el propers anys aquesta i altres qüestions sobre els mecanismes etiopatogènics de la vMCJ podran ser contestades. Finalment, el polimorfisme al codó 129 no sols participa en el genotip de cada malalt, sinó que pot condicionar o modificar el fenotip clinicopatològic de les diverses EET<sup>306</sup>.

## 5. La prevenció de les EET en els humans

### 5.1. En els centres sanitaris

La informació sobre les propietats infeccioses dels agents de les EET prové de l'experimentació animal, principalment amb l'agent de la tremolor ovina, i dels estudis epidemiològics, limitats en gran mesura per la baixa incidència d'aquest tipus de malalties. D'aquest coneixement es deriva que el risc de transmissió de les EET augmenta quan no existeix la barrera de l'espècie, i depèn de:

- a) La naturalesa de l'acte mèdic. El risc és més gran quan el material potencialment contaminant és el cervell, la medul·la espinal, o altres teixits d'infectivitat elevada (vegeu a l'apartat 4.1.2: Infectivitat dels teixits bovins), i quan la possible inoculació és directa a l'SNC.

Es consideren procediments d'alt risc totes les exploracions invasives en les quals s'entra en contacte amb òrgans i teixits amb infectivitat alta: intervencions neuroquirúrgiques (cranials i raquídies), oftalmològiques, punçons lumbar, i certs actes de cirurgia otorinolaringològica i maxil·lofacial.

- b) Les característiques clíniques del pacient que pugui ser font d'una contaminació. Les recomanacions següents fan referència als pacients amb EET coneguda, sospitada clínicament, o amb risc de desenvolupar una EET (taula 18).

#### 5.1.1. Contacte personal i clínic rutinari

No es coneix cap cas de difusió de les EET humanes fora de l'àmbit sanitari ni entre els treballadors sanitaris, la qual cosa suggereix que no existeix cap risc de contagi mitjançant el contacte social normal o clínic rutinari amb un pacient afectat per EET. Per tant, aquests pacients poden ser atesos sense mesures d'aïllament especials respecte a la resta de pacients.

Tenint en compte la resistència extraordinària d'aquests agents a la descontaminació, s'utilitzarà material d'un sol ús sempre que sigui possible. L'administració de fàrmacs mitjançant injecció i la recollida de mostres de sang es realitzarà amb les precaucions habituals per a aquests procediments en qualsevol tipus de pacient. No és gaire probable que l'exposició ocupacional a la sang representi un risc de transmissió d'EET.

Al laboratori clínic la utilització de les mesures de control d'infeccions habituals ha de proporcionar la protecció adequada al personal que manegi aquestes mostres; es tindrà especial cura per tal d'evitar-ne la ino-



culació accidental en preparar les mostres per a microscòpia o cultiu. Es prendran mesures especials per reduir al mínim la contaminació residual de l'equip; s'utilitzarà material d'un sol ús quan sigui possible (cambres comptacèl·lules, etc.); quan l'anàlisi manual amb material d'un sol ús no sigui possible, i calgui la utilització d'un equip automàtic, es considerarà la possibilitat de contaminació residual abans de fer-lo servir.

### 5.1.2. Procediments d'alt risc

Es consideren procediments d'alt risc totes les exploracions invasives en les quals s'entra en contacte amb òrgans i teixits amb infectivitat alta: intervencions neuroquirúrgiques (cranials i raquídiades), oftalmològiques, punxions lumbars, i certs actes de cirurgia otorinolaringològica i maxil·lofacial. Tenint en compte l'alt risc de contaminació, es recomana, una vegada confirmat el diagnòstic d'EET, que el material fet servir sigui tractat com a residu sanitari.

Tret dels casos en els quals s'hagi de descartar una altra malaltia potencialment tractable, la biòpsia cerebral s'ha de desaconsellar per diverses raons: es tracta d'una malaltia per a la qual no es disposa de tractament efectiu; no està exempta de morbimortalitat; l'obtenció d'una petita mostra de teixit pot ser insuficient per establir el diagnòstic; i, atès el risc de transmissió, cal tractar l'instrumental neuroquirúrgic com a residu sanitari després d'haver estat utilitzat en un pacient en el qual es confirmi el diagnòstic<sup>307</sup>.

Cal procedir amb especial cura en l'obtenció de mostres d'LCR per punció lumbar i de teixits distints de l'SNC per biòpsia, i únicament el personal especialitzat, coneixedor del risc existent, l'ha de dur a terme; s'utilitzaran guants i protecció ocular quan pugui haver-hi esquitxos. S'haurà d'advertir el laboratori de les característiques d'aquest tipus de mostres.

### 5.1.3. Situacions específiques

Els elèctrodes cutanis i els seus suports plàstics i les derivacions a terra utilitzats en l'EEG, s'hauran d'esterilitzar adequadament. En cas d'utilització d'elèctrodes subcutanis, intramusculars en electromiografia o intracranials, s'hauran de tractar com a residus sanitaris seguint els protocols establerts a l'apartat 5.1.6. Procediments de descontaminació i tractament dels residus.

Quan una pacient que pertanyi a algun dels grups de risc per a EET (taula 18) quedi embarassada, el part serà atès amb les precaucions recomanades per a les dones amb infeccions com l'hepatitis B. La placenta i les membranes del nadó s'hauran de tractar com a residus sanitaris seguint els protocols establerts a l'apartat 5.1.6.

La classificació dels teixits segons la seva infectivitat<sup>308</sup>, que deriva dels principals estudis experimentals amb l'agent de la tremolor ovina<sup>140</sup>, inclou la sang en el grup de teixits que es considera improbable que puguin transmetre la malaltia. No obstant això, durant els últims 30 anys s'han realitzat nombrosos intents per detectar l'agent infeccios a la sang perifèrica d'animals infectats experimentalment. Tot i que en alguns casos els resultats han estat negatius, diversos laboratoris han comunicat la presència irregular de nivells baixos d'infectivitat a la sang, particularment al leucoconcentrat –*buffy coat* o capa leucocitària (capa que separa els eritròcits del plasma després de la centrifugació i que conté principalment els leucòcits)–, tant durant el període d'incubació com a la fase clínica de la malaltia<sup>309-312</sup>. Un experiment recent ha demostrat un nivell baix d'infectivitat al plasma i la fracció crioprecipitada de ratolins infectats experimentalment amb MCJ<sup>313</sup>. També s'han portat a terme alguns intents per detectar l'agent a la sang de persones amb MCJ, i els resultats han estat positius en quatre ocasions (una amb sèrum i tres amb leucoconcentrat)<sup>314-317</sup>. Convé destacar que la presència de l'agent infeccios a la sang, tant dels animals infectats experimentalment com dels humans infectats de manera natural, s'ha demostrat en la transmissió a rosegadors de laboratori per mitjà de la inoculació intracerebral únicament. La via intravenosa s'ha assajat poques vegades, un experiment no va aconseguir transmetre la malaltia mitjançant la transfusió d'unitats de sang de tres pacients amb MCJ a tres ximpanzés<sup>168</sup>, però recentment s'ha comunicat la transmissió de l'agent de l'encefalopatia espongiforme bovina a una ovella per una transfusió de sang d'un animal de la mateixa espècie infectat experimentalment, durant el període d'incubació<sup>226</sup>. En conjunt, aquests experiments suggereixen que la sang dels pacients amb MCJ pot contenir nivells baixos d'infectivitat. Tanmateix, resulta difícil extrapolar de les dades experimentals a la pràctica clínica.

Tot i que no existeix evidència epidemiològica ni experimental sobre la transmissió de la malaltia per mitjà d'endoscòpia, i que la mucosa digestiva no es considera altament infectiva, l'endoscòpia digestiva s'ha de considerar com una via potencial de transmissió<sup>318</sup>.

Es recomana tractar l'endoscopi com a residu sanitari seguint els protocols establerts a l'apartat 5.1.6., en les situacions en què hagi estat utilitzat prèviament en:

- Pacients amb EET confirmada.
- Receptors d'hormones derivades d'hipòfisi de cadàver.
- Pacients amb símptomes neurològics sospitosos d'EET amb antecedents d'implantació de duramàter, trasplantament de còrnia o intervencions neuroquirúrgiques.

Es recomana que el processament habitual de l'endoscopi sigui precedit per dos cicles de neteja amb un detergent desincrustant alcalí en:

- Persones amb antecedents d'implantació de duramàter, trasplantament de còrnia o intervencions neuroquirúrgiques quan no hi hagi símptomes neurològics.
- Persones amb història familiar d'EET.

#### **5.1.4. Mesures per minimitzar el risc derivat de l'ús de material humà**<sup>319</sup>

Les hormones purificades de glàndules hipofítiques humanes (hormona del creixement i gonadotropina) han donat lloc a la transmissió de l'MCJ. Per tant, aquestes hormones no s'han d'obtenir de glàndules hipofítiques humanes.

Més de 100 casos d'MCJ han estat causats per implantacions de duramàter de cadàver, per la qual cosa s'aconsella que no s'utilitzi la reparació amb plàsties de duramàter, especialment en el cas de la neurocirurgia, excepte en el cas que no hi hagi una altra alternativa. Si és imprescindible la utilització de duramàter, únicament s'utilitzarà material que no sigui obtingut d'un conjunt de donants i que procedeixi de donants seleccionats curosament i sotmès a mètodes d'inactivació adequats<sup>320</sup>. De tota manera, s'haurà d'avaluar individualment d'acord amb els resultats quirúrgics obtinguts amb els diferents tipus de plàsties.

L'MCJ s'ha transmès en diverses ocasions per trasplantaments cornials. Ja que no hi ha alternatives per al trasplantament de còrnia, els donants s'han de seleccionar amb molta cura i tot l'equip utilitzat en la seva obtenció netejat i desinfectat de manera efectiva.

L'evidència que deriva dels estudis epidemiològics<sup>283</sup>, i el fet que entre els hemofílics, un grup de persones que rep derivats hemàtics amb freqüència, no s'ha comunicat cap cas d'MCJ, indica que les transfusions sanguínies no sembla que siguin un factor de risc important per a l'MCJ. En estudis experimentals la capacitat infecciosa de la sang és molt baixa, i únicament per mitjà del mètode extremament sensible de la inoculació intracerebral. Això no obstant, sembla aconsellable excloure els pacients amb EET coneguda, sospitada o amb risc d'EET de les donacions.

#### **5.1.5. Estudi *post mortem* de pacients amb sospita d'EET**

Les activitats en què pot haver-hi una exposició més gran als teixits amb infectivitat elevada són la realització de l'autòpsia i el processament de l'encèfal per al seu estudi histopatològic. Malgrat això, convé recordar que fins avui no hi ha evidència que cap treballador implicat en la realització d'aquest tipus d'estudis hagi adquirit la malaltia per exposició laboral, i que el risc d'infecció per al personal pot considerar-se inferior al de

les autòpsies de pacients amb hepatitis vírica o infecció per l'HIV<sup>266</sup>, per tant les precaucions que s'usen en aquestes són més que suficients per als pacients amb sospita clínica d'EET. Tanmateix, el material utilitzat necessitarà mesures de descontaminació específiques, seguint els protocols establerts a l'apartat 5.1.6.

La confirmació del diagnòstic d'EET té una gran importància, tant per rasons epidemiològiques com de salut pública; i tret dels casos hereditaris, en els quals és suficient l'estudi dels limfòcits de sang perifèrica, necessita l'obtenció de teixit de l'SNC. Tal com s'ha exposat anteriorment, es desaconsella la realització d'una biòpsia cerebral amb finalitat diagnòstica en un cas típic d'EET, per tant, només l'autòpsia permet establir el diagnòstic definitiu en la immensa majoria dels casos.

La tanatopràxia està desaconsellada en aquests pacients, els seus cadàvers no s'han d'utilitzar per a l'ensenyament d'anatomia ni d'anatomia patològica, i es recomana no embalsamar-los, tot i que aquesta pràctica comporta principalment un risc d'exposició a la sang i no als teixits amb infectivitat alta.

Els accidents relacionats amb l'exposició parenteral a material o residus contaminats per EET s'hauran d'enregistrar<sup>308</sup>.

#### 5.1.5.1. L'autòpsia

Els protocols que es detallen tot seguit no imposen obstacles desmesurats, per tant no hi ha cap raó per desestimar la realització de l'autòpsia d'un pacient amb sospita clínica d'EET<sup>266</sup>.

L'objectiu principal de l'autòpsia és permetre l'estudi neuropatològic per arribar a un diagnòstic definitiu, per a això serà suficient realitzar una «autòpsia parcial» que es limiti a l'extracció de l'encèfal; es pot realitzar a qualsevol sala d'autòpsies, ja que no necessita instal·lacions de seguretat ni d'aïllament específiques, i si es segueixen les recomanacions que es donen a continuació, no augmenta el risc per al personal implicat.

Si es decideix realitzar una presa de mostres d'altres teixits, es recomana portar-la a terme sense extreure els òrgans de les cavitats corporals, amb el cos envoltat de material absorbent en una bossa per a cadàvers. Una autòpsia completa, que inclogui la dissecció de vísceres i de la medulla espinal, s'ha de dur a terme en una sala d'autòpsies d'«alt risc»<sup>308</sup>.

Els estudis *post mortem* ha de realitzar-los personal amb experiència, que conegui els protocols que cal seguir en aquests casos. S'aconsella restringir l'accés a la sala i evitar situacions que siguin motiu de distracció.

A l'hora de la pràctica de l'autòpsia caldrà posar èmfasi en dos objectius:

a) Prevenció del contagi

S'han d'evitar les ferides penetrants accidentals, per a això s'utilitzaran bisturís de punta roma i equips de protecció que incloguin guants de seguretat per evitar talls i punxades. Aquests guants es posaran sota els guants convencionals i podran ser reutilitzats després d'una descontaminació adequada seguint els protocols establerts a l'apartat 5.1.6. Per protegir-se d'esquitxades i de la possible aerosolització s'usaran ulleres o viseres i mascaretes, com també casquets, davantals, bates, i mitges d'un sol ús.

b) Minimització de la contaminació

La taula d'autòpsies es cobrirà amb un plàstic d'un sol ús; en l'autòpsia parcial la seva finalitat serà protegir la zona cefàlica.

### **Extracció del cervell**

Sota el cap, que se situarà en la posició habitual, es col·locarà una capa gruixuda de fulls de paper de filtre per absorbir l'LCR i la sang que es puguin vessar.

Durant l'obertura del crani caldrà tenir molta cura per intentar no tallar el cervell, i si fos possible tampoc la paquimeninge. S'hi aconsella la utilització de serres o procediments que redueixin al mínim la possible aerosolització.

Abans de l'extracció del cervell es recomana l'obtenció de dues mostres (de lòbul frontal i cerebel) per a congelació. El cervell s'extraurà de la manera habitual i s'introduirà en un contenidor de plàstic de 10 litres amb tanca hermètica, amb una solució de formol de la qual es conegui el pes per poder calcular el pes de l'encèfal mitjançant una doble pesada. Tant el cervell fixat com la solució de formol mantenen la capacitat infecciosa i han de ser etiquetats adequadament.

En finalitzar l'autòpsia, el plàstic i les làmines de paper absorbent es col·locaran en un contenidor de residus sanitaris específics. Tot l'instrumental (serra, bisturís, etc.) i les superfícies que puguin estar contaminades, es descontaminaran seguint els protocols establerts a l'apartat 5.1.6.

#### **5.1.5.2. Manipulació dels teixits durant l'estudi neuropatològic**

El tall del cervell es realitzarà amb guants de seguretat per a talls i es realitzarà en una taula coberta per un llençol de plàstic sobre el qual es col·locaran diverses capes de cel·lulosa.

Per desactivar la infectivitat de l'MCJ, després del fixament en formaldehid, els talls de teixit triats per a l'estudi histològic, amb un gruix infe-

rior o igual a 5 mm, s'introduiran en àcid fòrmic concentrat (95-100%) durant una hora, si pot ser sota una campana extractora de fums. Posteriorment es mantindran almenys durant 48 hores en una solució de formol acabada de preparar<sup>266</sup>. La utilització d'àcid fòrmic redueix la infectivitat de manera significativa, i els talls poden ser tractats posteriorment com qualsevol altre teixit. L'àcid fòrmic pot ser eliminat en una pica d'acer inoxidable amb abundant aigua corrent. Sense aquest pas, els blocs de parafina poden continuar sent infecciosos<sup>321</sup>.

L'autoclau no és efectiva per descontaminar l'instrumental que s'hagi contaminat per teixit fixat en formol, prèviament al seu pas per àcid fòrmic<sup>322</sup>, i s'ha de submergir en hidròxid sòdic 1N durant una hora.

Les deixalles de teixits, les làmines de paper absorbent contaminades, etc., s'han de tractar d'acord amb els protocols establerts a l'apartat següent.

### **5.1.6. Procediments de descontaminació i tractament dels residus**

Els agents de les EET són extraordinàriament resistents a tots els mètodes de descontaminació física i química que s'utilitzen habitualment en la pràctica clínica i de laboratori; també són perdurables, de manera que els teixits contaminats poden mantenir la infectivitat durant anys.

Per aquest motiu es recomana, sempre que sigui possible, la utilització de material d'un sol ús en totes les pràctiques clíniques i de laboratori relacionades amb aquests agents. En el cas que no fos possible i calgués usar material reutilitzable, aquest se sotmetrà a una descontaminació seguint les recomanacions que s'exposen a continuació.

#### **5.1.6.1. Descontaminació**

##### **5.1.6.1.1. Neteja**

La neteja és la primera etapa del tractament del material i associa una acció mecànica i una acció detergent. És una fase essencial, atès que determina una reducció de la infectivitat i condiona l'eficàcia de les etapes posteriors; tanmateix, després de la fase de neteja el material continua sent contaminant.

Independentment del procediment utilitzat (mecànic o manual), el durà a terme personal format, que utilitzarà les mesures de protecció adients (guants, bata, mascareta i ulleres o viseres) durant el desenvolupament del treball.

Immediatament després de la seva utilització, el material serà submergit durant 15 minuts en un detergent desincrustant alcalí, separat de la resta del material clínic o de laboratori. Durant aquesta fase se n'eliminaran curosament les impureses macroscòpiques.

Taula 19. Desinfectants químics no efectius enfront dels agents de les EET

Alcohols	Oxid d'etilè
Formaldehid	Formalina
Glutaraldehid	Peròxid d'hidrogen
Iodòfors	Fenòlics
$\beta$ -propiolactona	

En l'etapa de neteja estan contraindicats tots els productes que continguin un aldehyd (formol, glutaraldehid), perquè augmenten la resistència dels agents enfront dels procediments d'inactivació posteriors.

Els líquids resultants de la fase de neteja seran tractats com a residus sanitaris específics.

#### 5.1.6.1.2. Inactivació

L'OMS recull tres procediments d'inactivació, però precisa que cap d'ells no constitueix una garantia absoluta<sup>323</sup>.

- Autoclau de prebuit (entre 134 i 138 °C durant 18 min.).
- Hidròxid sòdic (1N durant 1 h a 20 °C).
- Hipoclorit sòdic (2% de clor lliure durant 1 h a 20 °C).

#### Inactivació química

En certes circumstàncies de temperatura i temps, només alguns lleixius i solucions d'àlcals han mostrat la seva eficàcia per a la inactivació de l'agent implicat.

#### *Mètodes no efectius per a la descontaminació*

Els agents de les EET no es veuen afectats de manera significativa per un gran nombre de desinfectants químics habituals (taula 19)<sup>308</sup>.

#### *Mètodes efectius per a la descontaminació*

- Hidròxid sòdic (NaOH, sosa càustica): Una solució d'hidròxid sòdic pot no ser completament activa davant d'elevades concentracions d'aquests agents, especialment si estan protegits per material orgànic dessecat. És necessari humitejar constantment les superfícies exposades durant el tractament.

No existeix consens pel que fa a la concentració i al temps d'exposició, es recomana 1N (40 g/l) durant una hora (19,22-25), 2N (80 g/l) durant una hora<sup>266</sup>, o alternativament 1N durant dues hores<sup>266</sup>. L'exposició es realitzarà a temperatura ambient (20 °C).

No s'ha d'utilitzar amb material d'alumini o zinc, però es recomana per a l'acer. No produeix vapors però és corrosiu per als teixits corporals. És

molt irritant i danyós en pols, exposicions curtes suposen un risc mínim<sup>308</sup>. Produeix una reacció exotèrmica quan fa solució, cal procedir amb cura i dur la protecció adient<sup>308</sup>.

- **Hipoclorit sòdic (NaOCl, lleixiu comú, aigua de Javelle):** Es recomana realitzar la inactivació química amb hipoclorit sòdic amb una concentració de 20.000 a 25.000 ppm de clor lliure (2 a 2,5% de clor lliure), que s'aconsegueix amb lleixiu comú, amb 40 o 50 g/l de clor, acabat de diluir a la meitat. L'exposició es realitzarà a temperatura ambient (20 °C) durant 1 hora o fins a 2 hores.

La concentració de clor lliure es pot veure afectada significativament per la presència de material orgànic, especialment la sang.

És corrosiu per a l'acer però està recomanat per al tractament de l'alumini<sup>308</sup>.

És incompatible amb formaldehid, alcohol i àcids<sup>308</sup>.

És molt irritant per inhalació i per contacte amb la pell.

Així mateix, no s'ha d'oblidar la inestabilitat de les dilucions d'hipoclorit sòdic, per tant es recomana preparar-les a temperatura ambient i el mateix dia.

Alguns materials, com ara els coixinets dels elèctrodes tous de contacte, són poc resistents al lleixiu, per la qual cosa després d'unes poques aplicacions es deterioren i es fan inservibles.

## Inactivació física

### *Mètodes no efectius per a la descontaminació*<sup>308</sup>

- **Ebullició:** L'ebullició no afecta en gran manera aquests agents, per tant l'aigua bullent no és un mètode adient per a la descontaminació.
- **Calor seca:** El tractament amb calor seca del teixit infectat macerat a 160 °C durant 24 hores manté alguna infectivitat residual. Els homogeneïtzats de teixits liofilitzats exposats a 360 °C durant una hora també continuen sent infecciosos. Atès que el contingut en aigua del material que s'exposarà a la calor hi té influència, la dessecació confereix una resistència particular enfront de la inactivació. La infectivitat del teixit humit es destrueix a 200 °C durant 60 minuts. Després d'un minut a 240 °C s'aconsegueix una inactivació substancial però no completa tant de l'agent de l'MCJ com de la tremolor ovina.
- **Dessecació i exposició ambiental:** L'agent de l'MCJ pot sobreviure a temperatura ambient durant almenys 28 mesos i es pot trobar alguna infectivitat residual de l'agent de la tremolor ovina després del seu enterrament durant 3 anys. Per tant, llevat que s'utilitzin els mètodes de descontaminació física o química adients, existeix la possibilitat d'acumulació de material infectat a les superfícies i l'equip de treball.



Taula 20. Règims d'autoclaui recomanats actualment (prebuit)<sup>11</sup>

- 
- Cicle únic a 134 °C (+ 4/-0), 18 min
  - Sis cicles separats a 134 °C, 3 min
- 

- *Radiacions ionitzants i ultraviolades (UV)*: Les dosis de radiacions ionitzants i UV que inactiven els microorganismes convencionals tenen un efecte escàs sobre els agents de les EET. Les dosis requerides per produir una reducció significativa en la infectivitat són massa altes per tenir una utilitat pràctica.
- *Autoclaui*: El règim habitual d'autoclaui de 121 °C durant 15 minuts, que ha demostrat inactivar les espores bacterianes més resistents, no és efectiu amb els agents de les EET. De manera similar, el cicle que s'utilitza habitualment per esterilitzar el material quirúrgic (134 °C + 4/-0 durant 3 minuts) no és fiable.

### **Mètodes efectius per a la descontaminació**

Per a la majoria de les situacions l'autoclaui de prebuit és el mètode d'elecció per a la descontaminació.

- Autoclaui de prebuit.

Es recomana la utilització d'una autoclaui de prebuit (*porous load autoclaves*). Un cicle de 18 minuts de 134 a 138 °C o sis cicles de 3 minuts a la mateixa temperatura (taula 20).

- Autoclaui de tipus gravitatori.

Les autoclaus de tipus gravitatori (*gravity displacement autoclaves*) a 132 °C durant 1 hora inactiven tant l'agent de l'MCJ com el de la tremolor ovina. La temperatura inferior utilitzada comunament, 126 °C, no és fiable ni tan sols augmentant l'exposició a dues hores.

Tot i que sembla que no hi ha problemes pràctics amb aquestes combinacions de temps i temperatura, alguns estudis experimentals apunten cap a la persistència de certa infectivitat residual, probablement en relació amb la utilització de material amb títols d'infectivitat molt elevats i de soques més termostables.

#### **5.1.6.1.3. Procediments específics de descontaminació**

Es recomana per controlar la contaminació la utilització de safates esmaltades, de plàstic estable a la calor o d'un sol ús. Els elements reciclables s'hauran de tractar amb autoclaui després del seu ús. Les cobertes temporals de les superfícies i les safates d'un sol ús es ficaran dins d'una bossa per al seu tractament com a residus sanitaris específics.

### **Tractament del material utilitzat en intervencions neuroquirúrgiques o oftalmològiques**

Tal com s'ha comentat anteriorment, es recomana que aquest tipus de material sigui tractat com a residus sanitaris específics, tenint en compte l'alt risc d'infecció. Si es considera imprescindible reutilitzar determinats instruments, caldrà descontaminar-los amb un detergent i després submergir-los en 1 N NaOH durant una hora i per acabar autoclau a 134 °C durant una hora, o alternativament dos procediments de descontaminació química<sup>320</sup>.

### **Tractament de l'equip estable al calor i llenceria reutilitzable**

L'autoclau és el mètode d'elecció segons la majoria d'autors per als elements resistent a la calor com la llenceria reutilitzable, els instruments quirúrgics i per a estudis necròptics i instruments de laboratori. De manera excepcional, alguns instruments poden ser submergits en una solució d'hidròxid sòdic a 1N o hipoclorit sòdic que contingui 20.000 a 25.000 ppm de clor lliure durant almenys una hora.

### **Tractament de les superfícies de treball i de l'equip no resistent a la calor**

- **Detergents:** Pot determinar una dilució de l'agent o material contaminant, però no és un mètode efectiu per descontaminar les superfícies. Es recomana la seva utilització en una fase inicial («de neteja») prèvia a la descontaminació física o química, l'objectiu de la qual és l'eliminació de les impureses visibles a cop d'ull. El material reutilitzable s'ha de netejar immediatament després del seu ús, separat de la resta del material, mitjançant la immersió durant 15 minuts en un detergent desinfectant alcalí.
- **Hipoclorit:** Una exposició d'una hora a l'hipoclorit sòdic, amb una concentració de 20.000 a 25.000 ppm de clor lliure, és efectiva per a la destrucció de la infectivitat de la tremolor ovina en superfícies obertes. Cal humitejar-les repetidament amb el desinfectant durant el període de tractament. Com que aquesta concentració d'hipoclorit pot ser corrosiva per als metalls i alguns acabats de les superfícies, el treball que impliqui el maneig de materials infectats es durà a terme únicament en superfícies resistent o protegides per cobertes temporals de plàstic absorbent d'un sol ús.
- **Hidròxid sòdic:** S'utilitzarà una solució d'hidròxid sòdic a 1N. És necessari humitejar constantment les superfícies durant el tractament.

#### **5.1.6.2. Tractament dels residus**

Són residus sanitaris les substàncies i els objectes generats en centres, serveis i establiments sanitaris dels quals els posseïdors o productors es

desprenen o tenen la obligació de desprendre's. Els residus sanitaris de risc o específics es classifiquen en: grup III, que inclou els residus sanitaris infecciosos, i grup IV, que inclou les restes de substàncies químiques<sup>324</sup>.

Tots els residus sanitaris potencialment contaminats amb l'agent de les EET hauran de ser tractats com a residus sanitaris específics del grup III. L'única excepció són les solucions de formol i els teixits fixats en formol, que seran tractats com a residus sanitaris específics del grup IV. La utilització d'àcid fòrmic en els teixits fixats en formol redueix la infectivitat de manera significativa, i els talls poden ser tractats posteriorment com a residus sanitaris específics del grup III.

### **Tractament dels líquids (fixadors i solvents)**

Els fluids contaminats amb l'agent de les EET han de ser tractats com a residus sanitaris específics.

## **5.2. En la cadena alimentària**

A l'hora d'avaluar els riscos que representa per al consumidor la presència d'una malaltia com l'EEB, en una població d'animals d'abastament, cal considerar les possibilitats que un teixit infectat pugui arribar a entrar en els circuits de comercialització com a producte alimentari. Igualment, cal considerar les possibilitats reals que aquesta presència pugui constituir un perill per a la salut del consumidor.

El Comitè Director Científic de la Comissió de la UE (CDC), a l'hora de valorar el risc que l'agent causal d'aquesta malaltia bovina pugui arribar al consumidor, té en compte la probabilitat que la malaltia aparegui i/o es propagui en un determinat territori. És el que s'anomena *risc geogràfic*. Aquesta valoració del risc es fonamenta en els mecanismes de control que s'han instaurat per tal de detectar la malaltia, si apareix, i per evitar-ne la difusió, així com un monitoratge permanent d'aquelles dades que en permetin conèixer la situació real.

A falta d'una valoració actualitzada d'aquests paràmetres en els diversos territoris de la UE, el CDC defineix el *risc d'incidència* (risc que es doni la malaltia en funció dels factors que intervenen en la presència de la malaltia en un territori), el *risc de propagació* (risc que la malaltia es pugui difondre en funció dels factors que intervenen en la transmissió de la malaltia) i el *risc d'exposició* (definit com el nombre de persones que podrien resultar exposades a l'agent de l'EEB procedent d'un hipotètic animal infectat que entrés en la cadena alimentària) com a elements a quantificar per tal d'adoptar unes mesures o altres en la lluita contra l'EEB.

Aquest darrer risc, el d'exposició, és el punt sobre el qual incideixen les mesures de prevenció instaurades sobre la cadena alimentària.

En el marc d'aquestes garanties per al consumidor, la mesura primera serà assegurar l'absència d'animals infectats en els circuits de distribució alimentària, mitjançant proves de detecció de la malaltia. La realització sistemàtica de tests diagnòstics a la totalitat dels animals és una mesura costosa que resulta desproporcionada, tenint en compte els coneixements sobre la patogènia de la malaltia, els quals permeten assenyalar com a animals de risc només determinats grups d'edat i algunes subpoblacions molt determinades. A falta de sistemes i procediments que permetin assolir l'objectiu de la realització sistemàtica de tests a tots els animals, la prevenció resultaria igualment efectiva si es basés en la retirada dels materials específics de risc (MER), que són els teixits potencialment infectius dels animals sacrificats amb destinació al consum humà. Amb aquesta finalitat, cal un criteri segur per assenyalar quins teixits s'han d'eliminar i de quin grup dels animals destinats a sacrifici.

La combinació de la vigilància sistemàtica sobre determinades subpoblacions de risc, mitjançant els tests, i la retirada dels teixits potencialment infectius (MER) dels animals sacrificats amb destinació al consum humà dona les màximes garanties de protecció en el marc dels coneixements actuals sobre els mecanismes de transmissió de l'EEB.

Actualment, aquesta intervenció combinada ja inclou el cribratge de tots els animals adults i dels sospitosos de qualsevol edat. Fins arribar a la situació actual, la prevenció s'havia fonamentat en la separació dels teixits de risc que garantís l'absència de l'agent causal de l'EEB en les carns destinades a consum.

Segons el CDC, la retirada dels MER que contenen components del sistema nerviós central suposa l'eliminació del 95 % de la càrrega infectiva en els productes obtinguts d'un animal que pogués estar afectat de la malaltia. Si afegim a la llista de MER altres òrgans i teixits de molt baixa infectivitat, aquest percentatge se situa al 99,44 % d'eliminació de la càrrega infectiva (taula 21).

D'altra banda, cal obtenir de les carns procedents d'altres territoris idèntiques garanties de salubritat que les de les produïdes a Catalunya. Per tant, les mesures de protecció han d'incloure igualment una sèrie de controls dels productes de la carn procedents d'altres estats membres. L'establiment d'aquests controls en destinació permet assegurar que no entrin a la cadena alimentària productes que no ofereixin idèntiques garanties de protecció que les carns produïdes a Catalunya.

Taula 21. Càrrega infectiva en teixits d'un animal boví afectat

Teixit	(%) total de càrrega infectiva per animal	(%) càrrega acumulada
Cervell	64,1	64,1
Medul·la espinal	25,6	89,7
Ganglis del trigemin	2,6	92,3
Arrel dorsal dels ganglis	3,8	96,1
Illi	3,3	99,4
Melsa*	0,3	99,7
Ulls	0,04	99,74

\*Dada extrapolada de la tremolor ovina a l'EEB, per tant, no es pot considerar la infectivitat de la melsa en l'EEB.

[Font: Opinió del CDC sobre el risc d'exposició per a éssers humans (HER) per via alimentària en relació amb l'EEB.]

## 5.2.1. Eliminació dels materials específics de risc

### 5.2.1.1. Definició de materials específics de risc

Són considerats materials específics de risc (MER) tots aquells teixits i òrgans d'un animal sacrificat amb destinació al consum humà i que podrien ser infectius si l'animal estigués afectat d'EEB, segons els treballs experimentals realitzats fins ara. Igualment, la normativa que defineix els MER i en regula l'eliminació considera MER els teixits que puguin resultar contaminats per raó de proximitat anatòmica o pràctiques de manipulació amb teixits potencialment infectius.

### 5.2.1.2. Nivells d'infectivitat

S'han realitzat diversos estudis per determinar la presència de prions en els diferents teixits d'un animal afectat per l'EEB. Així, es poden classificar els òrgans i teixits en funció del risc de contenir aquest agent i, per tant, es poden distingir quatre nivells d'infectivitat potencial:

#### a) Infectivitat alta

Cervells de boví, ulls, medul·la espinal i ganglis de l'arrel dorsal. S'hi afegeix la duramàter, pituitària, crani, columna vertebral i pulmons, ja que poden resultar directament contaminats per algun dels teixits infectius, en el decurs de les operacions de sacrifici.

També s'hi afegeix la melsa d'oví i de cabrum, atesa la troballa de l'agent de l'EEB en aquest òrgan en ovins infectats experimentalment.

#### b) Infectivitat mitjana

Intestins (del duodè fins al recte) i teixit limfoide associat, amígdales, melsa, placenta, ùter, teixit fetal (per probabilitats elevades de contaminació a partir de la placenta), glàndules adrenals, fluid cerebrospinal i nòduls limfàtics.

c) Infectivitat baixa

Fetge, pàncrees, tim, medul·la òssia, ossos llargs, mucosa nasal, nervis perifèrics.

d) Infectivitat no detectada

Múscul esquelètic, cor, ronyó, calostre, llet, teixits adiposos extraïbles recuperats durant el sacrifici o amb posterioritat (quan no contenen nòduls limfàtics associats), glàndules salivals, saliva, tiroide, glàndula mamària, ovaris, testicles, teixit cartilaginós, teixit connectiu, pell, pèl, sèrum, coàgul de sang, orina, bilis i femta.

El concepte teòric de MER descrit abans s'ha complementat amb la informació sobre les pràctiques de processament de les canals durant les operacions de sacrifici i de separació i eliminació dels MER en les indústries càrnies. Així, la normativa reguladora del control dels MER ha assenyalat quins teixits calia eliminar de la cadena alimentària i ha especificat les parts potencialment comercialitzables que inclouen els teixits d'alta i mitjana infectivitat. Igualment, hi ha inclòs els teixits que, tot i no pertànyer a aquestes categories, podien resultar contaminats o estar en contacte amb teixits d'aquests mateixos grups durant la seva obtenció.

### 5.2.1.3. Regulació de l'eliminació dels MER

En l'eliminació dels MER, com a mesura de prevenció, es poden definir tres períodes:

a) *Des del 4 de juliol de 1996 fins al 30 de setembre de 2000* (taula 22)

En aquest període, a la UE es van donar passes per aplicar una separació homogènia dels MER a tots els estats membres. Fins que va entrar en vigor la Decisió 00/418/CE, la separació de MER havia quedat en mans dels països que volguessin aplicar aquesta mesura preventiva. A nivell comunitari la prevenció davant les EET s'havia fonamentat en altres mesures, com era les restriccions al comerç intracomunitari d'animals vius, carns i derivats procedents de determinades zones de risc amb alta incidència de la malaltia, però no en una retirada i eliminació sistemàtiques dels MER. Aquestes mesures afectaven únicament els països amb casos autòctons d'EEB, i es fonamentaven en la restricció o l'embargament als animals i les carns provinents d'aquests.

L'objectiu d'establir una retirada homogènia dels MER a tota la UE havia estat fixat per la Decisió 97/534/CE, que va patir successius ajornaments fins que es va concretar en la Decisió 00/418/CE. Mentrestant, es retirava els MER als escorxadors dels països on s'havien donat casos autòctons d'EEB: Bèlgica, França, Irlanda, Portugal, Luxemburg, Holanda i Regne Unit. No estava regulada aquesta pràctica a Àustria, Alemanya, Dinamarca, Grècia, Suècia i Finlàndia. Per últim, a Itàlia i

Taula 22. Mesures de protecció contra les encefalopaties espongiformes transmissibles (període juliol 1996/setembre 2000)

	Boví	Oví/Cabrum
Regne Unit	Prohibida l'entrada a l'Estat espanyol*	Eliminar intestins i melsa (qualsevol edat) Tots els MER en animals > 12 mesos
Portugal (excepte les illes Açores)		
Suïssa		
França	Eliminar intestins (qualsevol edat) Tots els MER en animals > 12 mesos	Eliminar intestins i melsa (qualsevol edat) Tots els MER en animals > 12 mesos
Bèlgica		
Països Baixos		
Luxemburg		
Liechtenstein		

MER: crani, inclòs l'encèfal, els ulls i la duramàter, les amígdals, la medul·la espinal i la columna vertebral amb els ganglis de l'arrel dorsal, així com els intestins i la melsa (oví/cabrum).

\* Els animals que hagin entrat a l'Estat espanyol amb anterioritat a l'entrada en vigor de la mesura es podran destinar a consum humà, després de l'eliminació dels MER.

Dates d'entrada en vigor: Regne Unit: 28.3.96 (D. 96/239/CE) (D. 98/256/CE).

Portugal: 25.9.98 (O. 24.9.98) (D. 98/653/CE).

Suïssa: 1.5.97 (O. 30.4.97).

Espanya els MER es retiraven només en aquells animals que provenien dels països on s'havia descrit la malaltia.

En conseqüència, la retirada dels MER a l'Estat espanyol durant aquest període es va iniciar per regulació pròpia i de manera parcial. L'inici de les mesures preventives sobre els animals a l'escorxador coincideix amb la descripció, l'any 1996, de la vMCJ, i amb els resultats de diversos estudis que la relacionaven amb l'EEB. Així doncs, les resolucions de 4 de juliol i de 9 d'octubre de 1996 del Ministeri de Sanitat i Consum (MSC) van instaurar l'obligatorietat de separar els MER de bovins, ovins i cabrum d'una determinada edat i d'una determinada procedència als escorxadors de l'Estat. Posteriorment, l'Ordre de 10 de maig de 1999 de l'MSC ampliava la llista de MER amb la incorporació de la columna vertebral dels bovins de més de 12 mesos d'edat de determinada procedència.

b) De l'1 d'octubre de 2000 fins al 30 de juny de 2001 (taula 23)

La Decisió 00/418/CE va homogeneïtzar la retirada dels MER a tota la UE. Per això, aplica criteris d'edat dels animals presentats a sacrifici, amb independència del seu origen. Únicament manté restriccions més grans en animals procedents de països amb elevada incidència de la malaltia (Regne Unit i Portugal).

Taula 23. Mesures de protecció contra les encefalopaties espongiformes transmissibles (període octubre 2000/juny 2001)

	Boví	Oví/cabrum
Regne Unit	Prohibida l'entrada de bovins vius a l'Estat espanyol <sup>(1)</sup>	Retirada de MER oví i cabrú > 12 mesos i melsa de totes les edats
Portugal (excepte les illes Açores)		
Tots els estats membres de la UE, inclòs l'Estat espanyol	Retirada de MER de bovins > 12 mesos i intestins de totes les edats	Retirada de MER oví i cabrú > 12 mesos i melsa de totes les edats
Països tercers	Retirada de MER de bovins > 12 mesos i intestins de totes les edats	Retirada de MER oví i cabrú > 12 mesos i melsa de totes les edats
Suïssa	Prohibida l'entrada de bovins vius a l'Estat espanyol <sup>(2)</sup>	Retirada de MER ovins > 12 mesos i melsa de totes les edats

MER: a) El crani, inclòs l'encèfal i els ulls, les amígdals, la columna vertebral, excloses les vèrtebres caudals i inclosos els ganglis radiculars posteriors, i la medul·la espinal dels bovins de més de 12 mesos d'edat, i els intestins, des del duodè fins al recte, dels bovins de qualsevol edat. b) El crani, inclòs l'encèfal i els ulls, les amígdals i la medul·la espinal dels ovins i cabrum de més de 12 mesos d'edat o en els quals s'observi l'erupció d'un incisiu definitiu, així com la melsa d'ovins i cabrum de totes les edats. c) Els cadàvers dels bovins, ovins i cabrum de qualsevol edat.

MER-UK-P: (Es refereix als MER d'animals del Regne Unit i Portugal, excepte les illes Açores.) Inclou els teixits classificats com a MER així com tot el cap, exclosa la llengua, però inclòs l'encèfal, els ulls, els ganglis del trigemin i les amígdals, el tim, la melsa, els intestins des del duodè fins al recte, i la medul·la espinal de bovins de més de sis mesos d'edat; i la columna vertebral, inclosos els ganglis de l'arrel posterior, de bovins de més de trenta mesos d'edat.

<sup>(1)</sup> Els animals que hagin entrat a l'Estat espanyol amb anterioritat a l'entrada en vigor de la prohibició d'entrada es podran destinar a consum humà, després de l'eliminació dels MER-UK-P.

Dates d'entrada en vigor de la prohibició d'entrada d'animals vius:

Regne Unit: 28.3.96 (D. 96/239/CE).

Portugal: 25.9.98 (O. 24.9.98).

<sup>(2)</sup> Els animals que hagin entrat a l'Estat espanyol amb anterioritat a l'entrada en vigor de la prohibició d'entrada (1.5.97. per Ordre de 30.4.97) es podran destinar al consum humà després de la retirada dels MER.

Durant aquest període, la intervenció sobre els animals portats a sacrifici, a l'efecte de la retirada dels MER, distingeix uns teixits que cal retirar en els animals de més de 12 mesos d'edat i uns altres que cal retirar en els animals de menys de 12 mesos d'edat.

D'especial rellevància és, durant aquest període, la publicació del Reial decret 1911/2000, de 24 de novembre, pel qual es regula la destrucció dels materials especificats de risc en relació amb les encefalopaties espongiformes transmissibles, que regula i unifica els procediments d'eliminació d'aquests teixits, observant les parts que cal separar i el processament posterior.

Igualment, durant aquest període, el Reial decret 221/2001, de 2 de març, inclou la columna vertebral a la llista de MER, amb la qual cosa



Taula 24. Mesures de protecció contra les encefalopaties espongiformes transmissibles (a partir de l'1 de juliol de 2001)\*

Risc geogràfic	Bovi	Oví/Cabrum
Categories 1 i 2	No hi ha materials de risc	No hi ha materials de risc
Categories 3 i 4	Qualsevol edat: intestins Més de 12 mesos: crani, amb cervell i ulls, amígdales i medul·la espinal	Qualsevol edat: melsa Més de 12 mesos: crani, inclòs cervell i ulls, amígdales i medul·la espinal
Categoria 5	Qualsevol edat: intestins Més de 6 mesos: tot el cap (exclosa la llengua), inclosos cervell, ulls, ganglis del trigemin i amígdales, el tim, la melsa i la medul·la espinal Més de 30 mesos: columna vertebral, inclosos ganglis de l'arrel dorsal	Qualsevol edat: melsa Més de 12 mesos: crani, inclòs cervell i ulls, amígdales i medul·la espinal

\*Reglament (CE) núm. 999/2001 del Parlament Europeu i del Consell.

calia extreure-la de tot animal sacrificat destinat al consum humà amb més de 12 mesos d'edat, amb independència del seu origen.

L'Ordre de 30 de març de 2001, per la qual s'estableixen mesures complementàries d'aplicació dels reials decrets anteriors, va ampliar les mesures de protecció. Aquest cop va afegir l'obligatorietat que la columna vertebral s'extregui sencera de la canal. Aquesta mesura rau en el fet que les pràctiques de manipulació que es donen en el moment d'obrir la canal, mitjançant partició de la columna vertebral amb serra, poden ser de risc a causa de la fragmentació de la medul·la espinal. En conseqüència, convé un sistema d'extracció de la medul·la que minimitzi que aquesta no pugui contactar i mantenir-se adherida a les carns fresques i ser vehiculada cap al consum.

c) *A partir de l'1 de juliol de 2001 (taula 24)*

En aquesta data entren en vigor determinats articles del Reglament (CE) 999/2001, de 22 de maig de 2001, que aplica nous criteris en la consideració de MER fonamentats en valoració del risc territorial. Així doncs, qualifica els territoris (regions o països) d'origen o procedència de l'animal sacrificat en cinc possibles categories, de la 1 a la 5, tenint en compte els criteris següents:

- i) Una anàlisi del risc dels factors potencials (alimentació del bestiar amb farines de carn, importació de farines de carn que poguessin contenir l'agent causal de l'EEB, importació d'animals que poguessin estar afectats, situació del territori respecte a les EET animals, nivell de control de la cabana, sistemes de processament de les despulles animals, etc.).

- ii) Un programa de formació de veterinaris, ramaders i professionals del sector.
- iii) La declaració obligatòria i l'examen de tots els bovins que presentin signes clínics d'EEB.
- iv) Un sistema de vigilància continuada.
- v) Un sistema d'anàlitiqes, en un laboratori autoritzat, de les mostres resultants del sistema de vigilància.

Aquesta situació respecte al risc de l'EEB en un territori comportarà la seva qualificació en funció dels resultats presentats. La qualificació definirà quina separació de MER caldrà aplicar sobre els animals procedents o originaris d'aquest territori que es presentin a sacrifici. Així doncs, als animals d'un territori qualificat dintre de les categories 1 i 2 no caldrà aplicar-los la separació de MER, mentre que als animals d'un territori qualificat dintre de la categoria 5 se'ls aplicarà una separació completa de MER.

Aquesta nova tendència en la normativa comunitària està actualment pendent que la qualificació dels diferents territoris sigui efectiva. El CDC ja advertia en els seus informes de la necessitat d'un monitoratge permanent dels paràmetres de seguiment de la malaltia i una actualització àgil de les mesures de prevenció en funció de l'evolució de l'EEB en cada territori. A falta de les dades necessàries per mantenir al dia aquests paràmetres, s'apliquen les mesures de prevenció vigents fins ara, que a l'efecte de separació de MER són prou restrictives, com ja s'ha descrit en els apartats anteriors.

#### 5.2.1.4. Retirada dels MER

Els MER són retirats als inicis del circuit de producció de la carn, tenint en compte quin és el moment en què aquesta retirada es pot fer amb millors garanties de prevenció. Així, la major part s'extreuen ja a l'escorxador i són separats de la cadena alimentària en aquell moment. Determinades parts poden ser extretes fora de l'escorxador, en establiments específicament autoritzats a l'efecte, amb l'objectiu de garantir que, en cap cas, aquests materials no arribaran al consumidor.

En els procediments de retirada dels MER s'han d'observar tota una sèrie de bones pràctiques de manipulació que estan protocol·litzades i són supervisades pels veterinaris oficials responsables del control sanitari als escorxadors.

En la inspecció *ante mortem*, que realitza el veterinari oficial adscrit a l'escorxador per dictaminar que un animal és apte per ser sacrificat amb destinació al consum humà, cal diferenciar els grups d'animals (partides) als quals caldrà aplicar separació de MER diferents. Aquesta distinció es fa a partir de les dades que consten a la documentació que acompa-

nya el bestiar a sacrifici, el document d'identificació per a bovins (DIB), on consten dades com l'origen, la data de naixement i l'ascendència.

Segons l'edat i d'acord amb els criteris actualment vigents en la separació de MER, hi haurà dues possibilitats:

- a) MER complet (MERC): Separació íntegra dels teixits considerats MER (animals de més de 12 mesos d'edat).
- b) MER parcial (MERp): Només els intestins sencers dels bovins de menys de 12 mesos i només les melses dels ovins de menys de 12 mesos. Està previst incorporar també a la llista de MER el mesenterí dels bovins de menys de 12 mesos.

Els bovins, ovins i cabrum de qualsevol edat que moren als corrals de l'escorxador tenen la consideració de MER. Aquesta incidència es comunica al Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca per tal de procedir a recollir mostres en el marc del programa de vigilància.

En l'ordre de sacrifici, l'empresa ha de sacrificar en primer lloc els MERp i després els MERC. Si l'ordre de sacrifici és tal que un animal MERC passa al davant d'un MERp, cal descontaminar el material que contacta amb els MER entre l'un i l'altre, o bé considerar MERC tot animal processat posteriorment.

El sistema d'atordiment utilitzat abans de procedir al sacrifici ha d'impedir la contaminació amb material encefàlic d'un animal a l'altre. La Decisió 00/418/CE ja prohibia determinades pràctiques d'atordiment que provocaven laceració de teixit nerviós. Igualment, cal supervisar l'ús correcte de pràctiques permeses, ja que algunes manipulacions podrien resultar contraproductes en sistemes que impliquin la perforació de la cavitat craniana durant l'atordiment.

Posteriorment al sacrifici es pot observar la dentició de l'animal i contrastar-la amb l'edat que consta al DIB que l'acompanya. Aquesta confirmació pot ser útil en la detecció d'errors documentals o de la correcta aplicació de les observacions fetes a la inspecció *ante mortem* en relació amb l'edat de l'animal.

Igualment, pot ser una bona pràctica preventiva, a l'efecte de la correcta separació dels MER, extreure teixits del cap abans de desarticular la zona atlantooccipital. Aquesta manipulació redueix el nombre d'operacions necessàries i el nombre de peces especejades que cal controlar durant la manipulació.

Un cop extreta la llengua, es comprova que no va acompanyada de fragments d'amígdals, i que aquestes resten íntegres en el conjunt de les estructures que s'eliminaran juntament amb el cap.

En la separació dels intestins, es considera tot el conducte que va des del pílor fins a l'anus. El tall de separació respecte als estòmacs no ha d'afec-

tar en cap cas porcions pertanyents a l'intestí. Se supervisa que el tall es faci en el punt correcte i que l'operari conegui els límits anatòmics de les porcions MER i les que no són MER.

En l'extracció de la medul·la espinal sense obertura del canal vertebral s'utilitzen sistemes d'aspiració o equivalents que garanteixin que el risc de contaminació creuada s'ha reduït el màxim possible abans d'obrir el canal vertebral.

Tots els estris que participen de l'obtenció dels MER són netejats i descontaminats amb la periodicitat que marqui l'ús a què es destinen. Cal avaluar si es pot netejar i descontaminar únicament al final de la jornada, o si cal incrementar la freqüència d'aquestes operacions.

Els desinfectants d'elecció en zones que hagin pogut estar en contacte amb el material de risc seran l'hipoclorit sòdic amb un 2% de clor lliure (20 g/l o 20.000 ppm) durant 1 hora, o bé l'hidroxid sòdic (sosa) a una concentració 2N durant 1 hora.

#### 5.2.1.5. Destrucció dels MER

Els MER es dipositen en recipients específics (recipients-MER) en el punt on s'obtenen i s'evacuen cap a uns contenidors també específics (contenidors-MER) a l'espera que una empresa, autoritzada per la Junta de Residus del Departament de Medi Ambient, en faci la recollida. Tant els recipients-MER com els contenidors-MER han de ser d'ús exclusiu per a aquests materials, estancs, sense pèrdues, de fàcil neteja i desinfecció i amb la suficient capacitat per a una jornada de treball. Tots ells van identificats amb les sigles MER. Els contenidors-MER cal que disposin d'un sistema de tancament. La ubicació dels contenidors-MER serà la que es determini per tal d'evitar contaminacions creuades, a l'exterior de la instal·lació o bé en un punt proper a la zona on seran recollits per l'empresa de transport. Estaran en una zona de fàcil neteja i desinfecció i no compartiran recorregut amb circuits de productes aptes per al consum humà. Tampoc no poden tenir una ubicació compartida amb subproductes.

Els MER obtinguts a l'escorxador són identificats mitjançant tintat amb una solució al 0,5% en pes/volum de blau patentat V (E-131, índex de color 42.501), utilitzant-lo mitjançant immersió, polvorització o un altre mitjà d'aplicació. També és d'ús habitual una solució de 0,5% en pes/volum de tartrazina (E-102, índex de color 19.140), i se'n podria utilitzar qualsevol altre que persisteixi després del tractament previ descrit en la normativa reguladora de la destrucció MER. La coloració dels MER té per objecte impedir la confusió dels MER amb alguns dels altres residus generats a l'establiment, i per tant que no es puguin vehicular cap a la cadena alimentària. Es pot procedir a la coloració dels MER en els recipients

Taula 25. Sistemes de destrucció dels MER

1. Amb tractament únic		
Incineració		Inhumació
2. Amb tractament previ*		
Greix natural/Procés discontinu atmosfèric	Incineració/Coïncineració	Inhumació
Greix natural/Procés discontinu pressió	Incineració/Coïncineració	Inhumació
Greix natural/Procés continu atmosfèric	Incineració/Coïncineració	Inhumació
Greix afegit/Procés continu atmosfèric	Incineració/Coïncineració	Inhumació
Greix afegit/Procés continu pressió	Incineració/Coïncineració	Inhumació
Desgreixament/Procés continu pressió	Incineració/Coïncineració	Inhumació

\*Sempre que el tint o marcador persisteixi després del tractament previ.

o en els contenidors, segons les garanties que ofereixi el sistema de treball per impedir aquesta confusió. Els materials considerats MER han de quedar tenyits de manera completa.

Els MER restaran a disposició de l'empresa de recollida en el punt assignat a l'efecte. En les operacions de recollida no hi haurà vessament de materials ni líquids en el punt de càrrega ni en cap punt del circuit a utilitzar en aquesta operació.

La destinació dels MER és igualment regulada al Reglament 999/2001, que assenyalava la incineració mitjançant tractament ja establert dels MER, i que ofereix alternatives com la coïncineració amb tractament previ o la inhumació en abocador autoritzat en determinats supòsits que ofereixin garanties mediambientals (taula 25).

### 5.2.1.6. Control de la retirada dels MER a Catalunya

Durant el període 1996-2000, la retirada dels MER a Catalunya es va fer només en aquell subgrup d'animals que reunia uns determinats criteris d'edat i origen, d'acord amb les resolucions del Ministeri de Sanitat i Consum de 4 de juliol i de 9 d'octubre de 1996. En conseqüència, el mercat podia proveir-se d'animals que, tenint idèntiques prestacions comercials, en uns calia retirar els MER i en altres no, per raó del seu origen. Per tant el volum de MER retirats en aquest període no respon als animals sacrificats. Amb l'extensió de les mesures de separació i eliminació dels MER a tots els animals de determinats trams d'edat, amb independència del seu origen, el volum de MER retirats va créixer considerablement i respon directament al volum d'animals sacrificats de cada tram d'edat (taula 26). Actualment a tots els bovins, ovins i caprins sacrificats se'ls retira els MER, a alguns de manera parcial (MERp) i a d'altres de manera completa (MERC).

Taula 26. Nombre de bovins als quals s'ha retirat MER a Catalunya

Període	Nombre d'animals
Juliol 1996/30 setembre 2000	355.573
1 octubre 2000/30 abril 2001	295.018

A Catalunya, la separació dels MER es fa en indústries de la carn dedicades al sacrifici de remugants i a l'especejat de les canals obtingudes. En cap cas poden arribar els MER als establiments detallistes ni punts de venda intermedis, a no ser que disposin d'autorització per retirar la columna vertebral, i, en aquest cas, podrien rebre únicament aquest material de risc.

Als escorxadors, el control dels animals que són objecte de sacrifici i dels procediments de preparació i comercialització de les canals obtingudes el realitzen els veterinaris oficials del Departament de Sanitat i Seguretat Social. Aquest control es basa en la inspecció *ante mortem* i *post mortem* dels animals i en el dictamen d'aptitud per al consum humà de les carns obtingudes. La retirada dels MER durant les operacions de sacrifici està inclosa dintre d'aquest conjunt de controls. A Catalunya tots els escorxadors compten amb la presència de veterinaris oficials en el moment en què se sacrifiquen animals amb destinació al consum humà.

Arran de l'aplicació d'un nou enfocament normatiu, els procediments de treball als escorxadors han patit importants modificacions. Aquests canvis són coincidents en el temps amb l'aparició de nous casos d'EEB a l'Estat espanyol. Es va fer necessària una intervenció homogeneitzadora que marqués pautes d'aplicació, donant concreció a la norma, i que proporcionés dades sobre el grau de protecció que s'oferia.

La intervenció inclou 18 punts, prèviament definits, els quals ha calgut vigilar i controlar individualment, per tal de garantir que les pràctiques de retirada dels MER de l'empresa eren les correctes (vegeu el requadre).

#### 5.2.1.7. Protecció a l'entorn laboral

L'agent causal de l'EEB pot representar un perill per als treballadors, ja que a l'entorn laboral hi ha possibles vies d'entrada degudes a les manipulacions de teixits potencialment infectius. En conseqüència, el nivell de risc a l'entorn laboral associat a l'EEB classifica l'agent etiològic com un agent biològic del grup 3.

Cal que es prevegin mesures de protecció personal per a aquells operaris que puguin contactar amb animals susceptibles de tenir la malaltia o bé que manipulin teixits potencialment infectats.

### Punts objecte de supervisió en la retirada de MER als establiments generadors

1. Programa de treball: *Descripció escrita de les pràctiques de l'establiment.*
2. Inspecció *ante mortem*: *Detecció d'animals que mereixen mesures específiques.*
3. Baixes *ante mortem*: *Destinació com a MER del cadàver íntegre.*
4. Ordre de sacrifici dels animals: *Evitant riscos creuats.*
5. Atordiment: *Impedint pràctiques no permeses i evitant riscos creuats.*
6. Comprovació de l'edat: *Detectant possibles errors documentals o frau.*
7. Separació del cap: *Evitant riscos creuats.*
8. Operacions posteriors sobre els caps: *Evitant riscos creuats.*
9. Separació dels intestins: *Íntegra. Impedint fragments de MER sobre el producte.*
10. Partició de la columna vertebral: *Evitant riscos creuats.*
11. Extracció de la medul·la espinal: *Íntegra. Impedint fragments de MER sobre el producte.*
12. Separació de la columna vertebral: *Evitant riscos creuats.*
13. Dipòsits: *Evitant desviaments en el destí.*
14. Coloració: *Identificant inequívocament.*
15. Evacuació: *Evitant desviaments en el destí i riscos ambientals.*
16. Neteja i desinfecció de recipients i estris: *Evitant riscos creuats.*
17. Higiene del personal manipulador: *Evitant riscos creuats i proporcionant protecció laboral.*
18. Documentació: *Permetent comprovacions, seguiment i monitoratge del procés.*

Les vies d'entrada possibles a l'organisme humà en l'entorn laboral són el contacte de ferides o lesions obertes en la pell amb material de risc, els esquitxos a les mucoses (ulls i boca), i la ingestió accidental.

En conseqüència, caldrà dotar-se de mitjans fonamentals per evitar la incorporació de l'agent infecciosos. Aquests mitjans inclouran les normes d'higiene personal, els elements de protecció de barrera com guants, protecció facial (mascaretes i ulleres), roba d'ús exclusiu i de cobertura completa i el maneig segur i la desinfecció dels estris de treball.

La descontaminació dels estris de treball es pot fer amb hipoclorit sòdic amb un 2% de clor lliure (20 g/l o 20.000 ppm) durant 1 hora, o bé amb hidròxid sòdic (sosa) 2N durant 1 hora. La descontaminació dels instruments amb procediments físics es pot fer amb calor seca (*poupinel* a 175 °C durant 2 h) o calor humida (autoclau).

S'ha descrit un protocol de treball segur específic per als veterinaris oficials que realitzen la presa de mostres d'encèfal per a la investigació de l'EEB.

## **5.2.2. Anàlisi per a la investigació de l'agent causal de l'EEB en els animals sacrificats als escorxadors**

### **5.2.2.1. Regulació de les investigacions analítiques en relació amb l'EEB**

La vigilància de les EET és fonamental per a l'estimació del risc existent en un país que un animal infectat pugui entrar en les cadenes alimentàries humana i/o animal. En la vigilància epizootiològica d'aquestes malalties es poden distingir dos períodes:

#### *a) Des de 1998 fins al 31 de desembre de 2000*

Per tal d'establir una base legislativa comunitària i fixar tots els requisits referents a la metodologia de la vigilància de les EET a la UE, l'any 1998 la Comissió va publicar la Decisió 98/272/CE, relativa a la vigilància epizootiològica de les EET. Mitjançant aquesta norma es van regular les mesures que havien d'adoptar els estats membres en cas de sospita d'EET en un animal, les condicions mínimes per al seguiment de l'EEB i de la tremolor ovina, així com els procediments de mostreig i les proves de laboratori per detectar la presència d'EET. També s'obligava els estats membres a la notificació immediata de qualsevol sospita de presència d'EET a l'autoritat veterinària competent.

Per a tots els estats membres s'establia l'aplicació d'un programa anual de seguiment de les EET que havia d'incloure, com a mínim, una presa de mostres d'encèfal dels animals sospitosos, una presa de mostres aleatòria de les poblacions de risc i l'anàlisi histopatològica d'aquestes mostres. En el cas que se sospités la possibilitat d'infecció per una EET, la canal i la resta d'òrgans interns de l'animal s'havien d'immobilitzar fins tenir el diagnòstic, evitant que passessin a la cadena alimentària.

La selecció de les mostres s'havia de fer segons l'edat dels animals, els signes clínics i els factors de risc com, per exemple, animals originaris de països amb EET autòctones, animals que haguessin consumit aliments potencialment contaminats i descendents de pares o mares infectats per EET. El nombre mínim d'exàmens neurohistopatològics anuals d'animals que s'havien de fer depenia de la població de bovins, de 20 mesos d'edat o més, i de la població d'ovins i caprins, de 12 mesos o més. La mostra tenia com a objectiu l'estudi dels animals més vells de la població.



El 8 de juliol de 1999 la Comissió Europea va publicar un informe sobre l'avaluació de proves ràpides de detecció *post mortem* de les EET en bovins, segons la qual es va comprovar que tres proves tenien bona sensibilitat i especificitat per detectar la presència d'EET en animals.

A Suïssa s'havia demostrat que la utilització d'aquestes proves millorava significativament l'eficàcia del programa de seguiment de l'EEB, sobretot si se centrava en els animals morts i en els animals sacrificats d'urgència.

És indiscutible que la utilitat d'un test de diagnòstic ràpid i precís donaria avantatges a l'hora de tractar el problema de l'EEB i de les EET en general. Tenint en compte aquests aspectes i els resultats i l'experiència obtinguts en l'aplicació del programa de vigilància epizootiològica de les EET establert a la Unió Europea fins ara, la Comissió va modificar el programa de vigilància.

b) *A partir de l'1 de gener de 2001*

Les decisions 2000/374/CE, 2000/764/CE i 2001/8/CE van modificar la 98/272/CE i van incorporar les noves proves ràpides de laboratori autoritzades amb la finalitat de millorar la detecció de la presència d'EEB. En els casos d'animals sospitosos de patir l'EEB, els teixits dels bovins destinats a les proves de laboratori s'havien d'analitzar histopatològicament i quan els resultats fossin dubtosos o negatius, o bé el material s'hagués autolisat, els teixits s'havien d'analitzar per exàmens immunocitoquímics, d'immunotransferència o de comprovació de les fibril·les característiques per microscòpia electrònica. Els animals no sospitosos examinats en el context del programa anual de seguiment o sotmesos a un examen de rutina s'havien d'analitzar per algun dels mètodes següents:

- Prova d'immunotransferència, basada en un procediment de transferència Western per a la detecció del fragment PrP<sup>Sc</sup> resistent a la proteasa (Prionics Check Test).
- ELISA de quimioluminescència, amb un procediment d'extracció i una tècnica ELISA on s'utilitza un reactiu quimioluminescent intensificat (Enfer Test).
- Immunodosificació de PrP<sup>Sc</sup> pel mètode immunomètric en dos punts, anomenat mètode *sandvitx*, efectuat després de les fases prèvies de desnaturalització i concentració (Bio-Rad).

En el cas de resultats dubtosos o positius de les proves de diagnòstic ràpid, s'havien de confirmar en un laboratori oficial mitjançant una segona confirmació histopatològica per detectar la presència de vacúols i una tercera immunocitoquímica per determinar la presència de proteïna prió.

Vista l'evolució de la malaltia en la UE, amb l'aparició de nous casos d'EEB en països lliures fins aleshores com Alemanya o Espanya, va ser

necessari prendre mesures més dràstiques per protegir la salut del consumidor, i la UE va publicar el Reglament (CE) 2777/2000, que establí que a partir de l'1 de gener de 2001 no es podia lliurar al consum cap animal boví de més de 30 mesos que no hagués estat sotmès, amb resultat negatiu, a una prova de detecció de l'EEB per una tècnica ràpida autoritzada.

Paral·lelament, es va instaurar un procediment de compra, per part dels estats membres, de tots els bovins de més de 30 mesos que no haguessin estat analitzats amb la finalitat de destruir-los com a MER. Aquesta mesura era transitòria fins l'1 de juny de 2001, fins que tots els països disposessin de la capacitat analítica suficient per testar tots els animals de més de 30 mesos.

El Reial decret 3454/2000, que també va entrar en vigor l'1 de gener de 2001, i que era la transposició al dret estatal de les diverses normatives de la UE que s'havien anat publicant fins aleshores, establí el Programa integral coordinat de vigilància i control de les EET. En aquest programa es preveia, entre d'altres aspectes, la presa de mostres i la investigació de l'agent causal de l'EEB en:

1. L'espècie bovina:

- Animals de més de 30 mesos, morts a les explotacions o durant el transport.
- Animals de més de 20 mesos sospitosos de patir l'EEB: amb símptomes neurològics o de comportament on la malaltia no es pugui excloure basant-se en la resposta al tractament o després d'un examen de laboratori.
- Animals de més de 30 mesos objecte de sacrifici especial d'urgència.
- Animals de més de 20 mesos originaris de França, Irlanda, Suïssa i Portugal.
- Animals de més de 30 mesos sacrificats amb destinació al consum humà.

2. Les espècies ovina i cabruna:

- Animals de més de 12 mesos amb símptomes neurològics.
- Animals de més de 12 mesos moribunds sense signes de malaltia.
- Animals de més de 12 mesos amb altres patologies progressives.

Per tal d'augmentar el nivell de seguretat oferida al consumidor, el 15 de febrer de 2001 va entrar en vigor a Catalunya el Decret 40/2001, que rebaixava l'edat dels bovins als quals s'obligava a realitzar les proves de detecció ràpida per l'EEB a 24 mesos.

El Reglament 999/2001 del Parlament Europeu i del Consell, que va entrar en vigor l'1 de juliol de 2001, pel qual s'estableixen disposicions per a la prevenció, el control i l'eradicació de determinades EET, amplia el programa de seguiment de l'EEB i la tremolor ovina que han de portar a terme els estats membres. Aquest Reglament, modificat posteriorment pels reglaments 1248/2001 i 1326/2001, estableix un nou protocol de presa de mostres que permet donar una imatge epizootiològica completa de la situació en matèria d'EET. D'acord amb aquestes disposicions, a partir de l'1 de juliol de 2001 s'han d'investigar:

1. En l'espècie bovina:

- Tots els animals bovins de més de 30 mesos que entren en la cadena alimentària (a Catalunya, els de més de 24 mesos).
- Tots els bovins de més de 24 mesos que s'hagin de sacrificar d'urgència.
- Els bovins de més de 24 mesos, no destinats a consum humà, que hagin mort (excepte els que hagin estat sacrificats en el marc de la lluita contra una epizootia).
- Tots els bovins adquirits per procedir a la seva destrucció, els sacrificats a causa d'un accident, i els que s'ha trobat que estan malalts en una inspecció *ante mortem*.
- Tots els bovins adquirits per procedir a la seva destrucció nascuts entre l'1 d'agost de 1996 i l'1 d'agost de 1997.

2. En les espècies ovina i cabruna:

- Una mostra representativa dels animals de més de 18 mesos, sacrificats per a consum humà.
- Una mostra representativa dels animals de més de 18 mesos que hagin mort o que hagin estat sacrificats sense destinació al consum humà (excepte els que hagin estat sacrificats en el marc de la lluita contra una epizootia).

Els criteris pel que fa als mètodes i a les tècniques de detecció pràcticament no varien de les mesures ja establertes amb anterioritat.

L'Ordre de 26 de juliol de 2001 actualitza el Reial decret 3454/2000, tenint en compte el contingut dels darrers reglaments comunitaris. Amb aquesta norma l'Estat espanyol rebaixa l'edat d'anàlisi als bovins de sacrifici normal, destinats al consum humà, a 24 mesos, com ja va fer Catalunya el 15 de febrer de 2001.

#### **5.2.2.2. Poblacions objecte d'estudi**

La PrP<sup>Sc</sup> es troba al cervell i al teixit nerviós central dels animals que presenten signes clínics de malaltia i d'aquells que en pocs mesos la des-

envoluparan. La seva presència en el bestiar apareix paral·lelament al desenvolupament de la infectivitat.

La PrP<sup>Sc</sup> no s'ha detectat en cervell de bovins o altres teixits nerviosos al principi de la malaltia, però en infeccions experimentals, on s'administren altes dosis infectives, s'ha trobat infectivitat en l'ili. No obstant això, no s'ha detectat en infeccions naturals.

Atès que, actualment, cap mètode no detecta l'EEB al principi de la infecció i que aquesta malaltia sembla que té un període mitjà d'incubació de 4-6 anys, els programes d'anàlisi de la UE estan dirigits a animals de més de 30 mesos. No obstant això, han rebaixat l'edat a 24 mesos en els casos dels animals que pertanyen a determinades poblacions de risc com són els animals sotmesos a sacrificis d'urgència, amb alguna simptomatologia, i els morts a la granja.

Alguns casos d'EEB s'han identificat gràcies als tests realitzats a animals aparentment sans o destinats a sacrifici d'urgència. Les EET poden tenir una simptomatologia que, a més de variada, pot resultar poc evident en els primers moments de la fase clínica. Per aquest motiu, cal realitzar un examen detallat durant la inspecció *ante mortem*, dirigit especialment a la detecció de qualsevol símptoma compatible amb aquestes patologies.

Els animals destinats a sacrifici d'urgència són una població de risc ja que moltes de les patologies que es presenten amb més freqüència, com per exemple les fractures, poden ser conseqüència de trastorns neurològics, si bé encara no es pot arribar a diagnosticar de forma inequívoca en una inspecció *ante mortem* que es tracta d'EEB.

Quan a l'escorxador arriben animals sospitosos amb símptomes nerviosos, d'agressivitat, por, hiperestèsia, moviments anormals del cap, incoordinació, postures anòmales, hipermetria, caigudes i dificultat per aixecar-se, pruija, tremolors, «mirada d'astrònom», tetanisme, moviments en cercle, etc., els serveis veterinaris oficials declaren els animals no aptes per al sacrifici i els intervenen cautelament, en viu, juntament amb tots els individus procedents de la mateixa explotació. Aquesta situació es comunica al Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca per tal que es procedeixi al sacrifici de l'animal sospitós i a la seva posterior anàlisi.

### 5.2.2.3. Proves de detecció

L'anàlisi sistemàtica dels animals de més de 24 mesos a l'escorxador fa possible que es detectin animals que no presenten signes d'EEB. Aquest és un mètode addicional de protecció de la salut dels consumidors, ja que el sistema principal de protecció és l'eliminació dels MER de cada animal sacrificat.

### 5.2.2.3.1. Presa de mostres

La presa de mostres es fa a l'escorxador. Es trasllada el cap degudament identificat i correlacionat amb la canal i la resta de despulles a la zona habilitada per efectuar immediatament l'extracció del tronc de l'encèfal a través del *foramen magnum*, mitjançant una cullera de presa de mostres. La mostra ha de constar de la medul·la oblonga sencera des dels peduncles cerebel·losos caudals (secció anterior a l'òbex). Per al diagnòstic de l'EEB és molt important la recollida de la meitat caudal del tronc (medul·la oblonga), lloc on es localitzen les lesions inicials d'aquesta malaltia (figura 16). Quan l'extracció de la mostra no permet obtenir la quantitat de teixit suficient per fer l'anàlisi, aproximadament 5 cm de medul·la oblonga, es procedeix a l'obertura del crani per tal de poder extreure correctament la mostra necessària.

S'introdueix el tronc de l'encèfal en un pot de recollida en el qual ha de constar la identificació de l'animal. La mostra no es fixa, només es conserva en refrigeració (4 °C) i es trasllada al laboratori en un termini màxim de 24-48 hores des del sacrifici de l'animal en una nevera portàtil amb fred, degudament identificada com a risc biològic.

### 5.2.2.3.2. Tècniques analítiques

#### *Proves de detecció ràpida*

Les proves de detecció ràpida d'EEB determinen si el teixit que s'analitza té un nivell detectable de PrP<sup>Sc</sup>. Fins al moment, la Comissió Europea ha aprovat tres mètodes:

- CEA (nom del test: Biorad).
- Prionics AG (nom del test: Prionics Check).
- Enfer Technology Ltd. (nom del test: Enfer Test System).

La Comissió està estudiant la possibilitat d'autoritzar-ne cinc més. Per a l'avaluació d'aquests tests s'està valorant la seva habilitat per distingir les diferents EET. Totes les proves només són per a diagnòstics *post mortem*:

- ID-Lelystad (Holanda)
- Imperial College of Science Technology and Medicine (Regne Unit)
- The Institute of Neurodegenerative Disease University of California, San Francisco (IND/UCSF) (Estats Units d'Amèrica)
- Perking Elmer Life Sciences (Regne Unit)
- Prionics AG (Suïssa) (Aquesta companyia ja té aprovada una tècnica de transferència Western, aquesta aplicació es refereix a un test amb metodologia ELISA)

Figura 16. Zona del tronc de l'encèfal d'elecció (òbex) per a la realització del test ràpid



L'avaluació la realitza la Direcció General de Sanitat i Protecció dels Consumidors (DG SANCO) de la Comissió Europea en col·laboració amb l'Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), a Geel (Bèlgica).

Els tres tests aprovats detecten l'agent infecciós, PrP<sup>Sc</sup>, en el sistema nerviós central i tenen l'avantatge que són ràpids, fàcils de realitzar i que permeten analitzar un gran nombre de mostres. Detecten animals preclínic, és a dir, que encara no han mostrat cap símptoma clínic. El CEA/Biorad ha detectat animals preclínic experimentalment. El test Enfer també n'ha detectat, particularment en animals de ramats que han estat sacrifi-

cats a causa de la detecció d'algun cas d'EEB. El test Prionics ha detectat animals preclínic procedents de ramats amb casos d'EEB i també en animals normals portats a l'escorxador.

Per a l'elecció d'un o altre mètode es té en compte, entre d'altres, l'experiència del laboratori on s'han de realitzar les anàlisis, el coneixement de la tecnologia del test i el grau d'automatització desitjat. A Catalunya s'està utilitzant, actualment, el test Prionics.

#### *Examen histopatològic*

Aquesta prova és la que es realitza en els casos sospitosos, excepte quan el teixit nerviós de l'animal a examinar estigui autolitzat, i per fer la confirmació dels positius a les proves de detecció ràpides.

Les mostres es fixen en formol al 10%, s'inactiven en àcid fòrmic, es posen en parafina i es realitzen els talls histològics. Les preparacions es tenyeixen en hematoxilina-eosina i s'observen les lesions microscòpiques (lesions vacuolars o espongiformes compatibles amb les EET) (figura 17).

#### *Examen immunocitoquímic*

És un dels exàmens d'elecció quan el resultat de l'examen histològic és dubtós o negatiu o quan es tracta d'una mostra autolítica d'animals sospitosos o bé quan no s'ha pogut fer l'examen histopatològic per confirmar els resultats dubtosos o positius de les proves de diagnòstic ràpid.

El procediment és el mateix que per a l'examen histopatològic, excepte en la tinció. L'objectiu d'aquesta tècnica és el marcatge del prió mitjançant l'anticòs específic i la visualització de l'anticòs per reacció cromogènica.

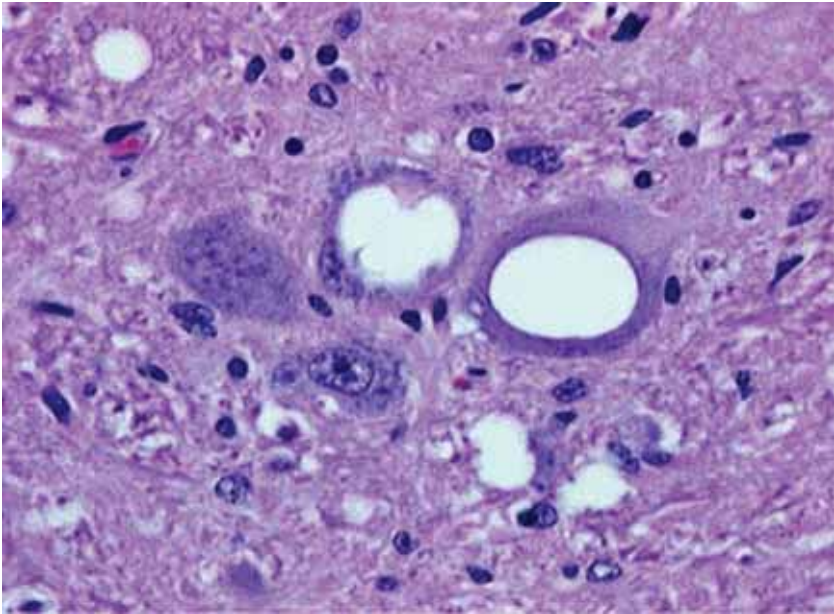
#### *Examen d'immunotransferència o demostració de les fibril·les característiques per microscopia electrònica*

És un dels altres exàmens d'elecció quan el resultat de la prova histològica és dubtós o negatiu o quan es tracta d'una mostra autolítica d'animals sospitosos o bé quan no s'ha pogut fer l'examen histopatològic per confirmar els resultats dubtosos o positius a les proves de diagnòstic ràpid. S'observen al microscopi electrònic extractes d'encèfal no fixats, tractats amb detergents per observar les fibril·les característiques, compostes per una forma modificada de proteïna PrP considerada important en la patogènesi d'aquestes malalties.

#### *Altres proves en estudi*

Actualment s'estan fent estudis referents a tècniques per tal de detectar PrP proteasa resistent a l'orina, marcadors en la sang associats a les EET, i altres mètodes que permetin amplificar la proteïna prió resistent per tal d'augmentar la sensibilitat de les tècniques.

Figura 17. Vacúols en el pericarió de dues neurones en una vaca afectada per l'EEB



Aquestes tècniques anirien adreçades a la detecció de la malaltia en viu, la qual cosa permetria millorar el seu diagnòstic en les fases preclíniques i comportaria una millora substancial en el control de les EET.

#### **5.2.2.3.3. Mesures de prevenció a l'espera de resultats i davant d'un resultat positiu**

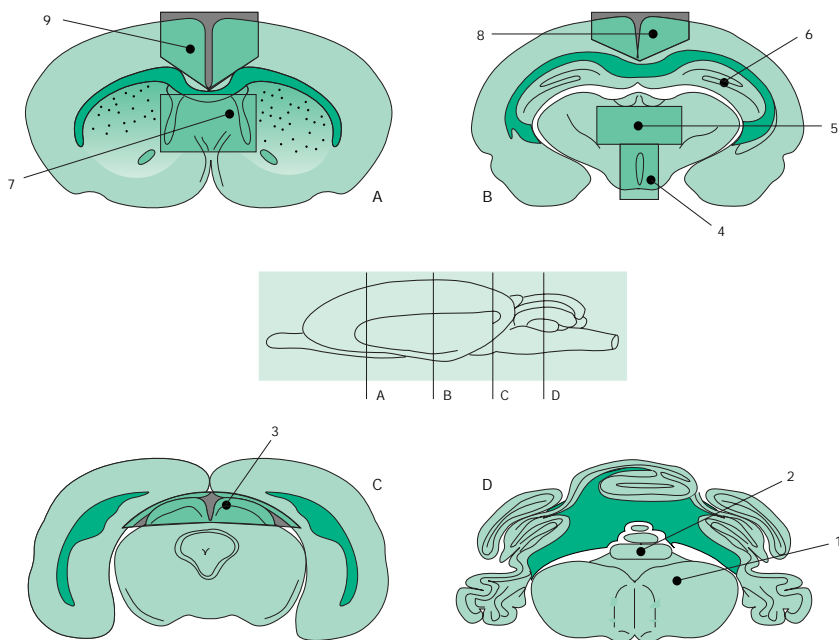
Mentre es realitzen les proves ràpides de detecció d'EET, totes les parts del cos de l'animal mostrejat, inclosa la pell, s'han de retenir fins que s'hagi obtingut un resultat negatiu. Un cop es disposa dels resultats negatius es procedeix al marcatge sanitari i, per tant, es poden comercialitzar.

En el cas que es detecti un resultat positiu o dubtós totes les vísceres i altres teixits dels animals procedents de la mateixa explotació són intervinguts pels serveis veterinaris oficials.

En els casos positius d'animals sacrificats per a consum humà, com a mínim la canal immediatament anterior a la positiva i les dues immediates posteriors de la cadena de sacrifici han de ser destruïdes com a MER, a més de la mateixa canal positiva, per tal d'evitar qualsevol risc per contaminació creuada.



Figura 18. Àrees representatives en malalties priòniques



1: Pont del cerebel. 2: Vermis del cerebel. 3: Tectum del mesencèfal. 4: Hipotàlem. 5: Tàlem. 6: Hipocamp. 7: Cos paraterminal. 8: Escorça cerebral posterior. 9: Escorça cerebral anterior. (Estudi experimental en ratolí de Fraser i Dickinson, 1968)

### 5.2.3. Actuacions a Catalunya

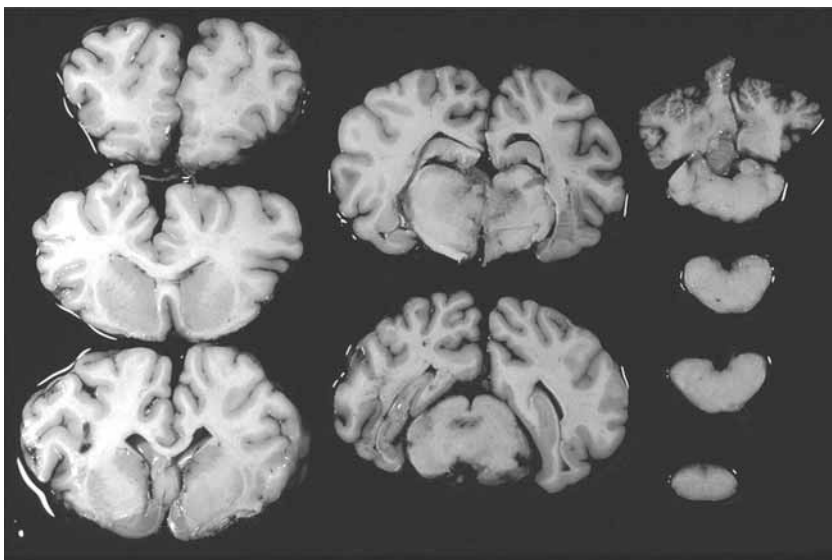
#### 5.2.3.1. De 1996 fins al 31 de desembre de 2000

A Catalunya l'any 1996, abans de la publicació de la normativa comunitària pel que fa al cas, es va iniciar el Programa de vigilància de l'encefalopatia espongiforme bovina i de la tremolor ovina, amb l'objectiu de comprovar la presència o absència d'EEB en els animals adults de l'espècie bovina i la de tremolor ovina en ovins i caprins sacrificats a Catalunya.

Seguint les recomanacions i els criteris dels projectes normatius relacionats amb la vigilància de les EET, es va realitzar la recollida de l'encèfal de tots els animals sospitosos, pel fet de presentar símptomes nerviosos, i una recollida aleatòria d'animals de més de 4 anys.

Quan va entrar en vigor la Decisió 98/272/CE, on es descriuen els requisits sobre la vigilància de les EET a la UE, es va redissenyar el Programa segons

Figura 19. Talls seriats de tot l'encèfal d'una ovella



aquesta Decisió. Se seguia fent una recollida aleatòria, però es decidien els animals a mostrejar tenint en compte l'edat, els signes clínics i els factors de risc, i es mantenia la investigació de tots els animals sospitosos. Es consideraven sospitosos els bovins de més de 20 mesos i els ovins de més de 12 mesos que presentessin signes neurològics, els moribunds sense signes de malalties infeccioses o traumàtiques i els bovins de més de 4 anys i els ovins/caprins de més de 12 mesos amb altres patologies progressives. Es feia especial atenció als animals originaris de països amb casos autòctons d'EET i, si es disposava de la informació, s'havien de prendre mostres d'aquells animals que se sospités que havien menjat aliments potencialment contaminats.

Les mostres van ser recollides pels serveis veterinaris oficials als escorxadors de Catalunya i s'enviaven al Laboratori del Grup de Recerca de Patologia Animal de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, on es realitzava l'estudi histopatològic general orientat a la recerca de les EET. Es feien seccions transversals seriadades de tot l'encèfal i es prenen mostres de diferents localitzacions, incloent-hi àrees representatives, especialment les que es relacionen amb el tronc de l'encèfal, els nuclis medulars caudals i el cerebel (figures 18 i 19).

Taula 27. Mostres analitzades en el període 1996-2000

Recollida de mostres	Espècie bovina	Espècie ovina	Espècie cabruna	Total
Sospitoses	34	42	9	85
Aleatòries	690	361	8	1.059
Originàries de països amb EEB	24	0	0	24
Total	748	403	17	1.168

En el cas que un animal presentés lesions compatibles amb una EET s'enviava una mostra de teixit nerviós al Departament d'Anatomia Patològica de la Facultat de Veterinària de la Universitat de Saragossa, que és el laboratori estatal de referència per al diagnòstic d'aquestes malalties. Allí es realitzava la tècnica d'immunohistoquímica per tal de detectar la presència de proteïna prionica específica.

Des de 1996, any d'inici del Programa, fins l'1 de gener de 2001, data en què va entrar en vigor la nova normativa, es van recollir un total de 1.168 mostres, de les quals cap no va donar resultat positiu. A la taula 27 es presenta el nombre total de mostres preses en aquest període, classificades per espècie i segons fossin aleatòries, sospitoses o procedents de països amb casos autòctons d'EEB.

### 5.2.3.2. A partir de gener de 2001

En compliment del Reial decret 3454/2000, que regula l'aplicació del Programa integral coordinat de vigilància i control de les EET, el gener del 2001 es van començar a analitzar tots els bovins de més de 30 mesos destinats al consum humà. A partir del 15 de febrer, amb l'entrada en vigor del Decret 40/2001, es van mostrejar tots els bovins de més de 24 mesos.

Actualment, els serveis veterinaris oficials dels escorxadors autoritzats per sacrificar bovins de més de 24 mesos recullen el tronc de l'encèfal de tots aquests animals. Les mostres són trameses als tres laboratoris de rutina del Departament de Sanitat i Seguretat Social, on s'analitzen pel mètode Prionics Check Test. En cas de resultats positius o dubtosos, les mostres s'envien al Laboratori de Referència de Malalties Prioniques Animals de Catalunya (PRIOCAT), per a la seva confirmació.

Durant el primer semestre de l'any 2001 s'han analitzat 2.991 mostres, de les quals 1 va ser positiva (taula 28).

### 5.2.3.3. Controls de les carns fresques en establiments alimentaris de destinació

Una altra actuació preventiva realitzada en relació amb les EET animals és el reforç dels controls en destinació dels animals de les espècies bovina,

Taula 28. Mostres analitzades en el primer semestre de 2001

Bovins de més de 24 mesos		Total	Bovins de més de 20 mesos					Total
Urgència	Sacrifici normal		França	Irlanda	Portugal	Suïssa	Identificació incompleta	
60	2.646	<b>2.706</b>	95	9	0	1	180	<b>285</b>

ovina i cabruna i de les seves carns i productes derivats, per tal de vetllar perquè es respectin les disposicions legals vigents adreçades a la protecció de la salut de les persones. Es fa un seguiment especial perquè no arribin MER o carns amb restes d'aquests materials.

Pel que fa a les carns i productes carnis, són sotmesos a un control veterinari que consisteix en un control documental, d'identitat i físic dels productes. Es comprova que es compleixin les condicions establertes a la normativa vigent i s'efectua una inspecció visual detallada a l'efecte de detectar qualsevol irregularitat, tant en els productes com en la seva presentació, marcatge i/o etiquetatge. Quan es detecten irregularitats es procedeix immediatament a la seva immobilització i es destrueixen o es retornen a l'origen.

A Catalunya, en el període 1997-2000, s'han realitzat 15.807 controls específics en destinació de carns i productes carnis d'altres estats membres de la UE, a més a més dels controls de rutina que es realitzen a totes les sales d'especejament de carns, magatzems frigorífics distribuïdors i punts de venda.

### 5.3. Vigilància de les EET en els humans

El principal objectiu de la vigilància de les EET humanes és conèixer les característiques clíniques, anatomopatològiques i moleculars d'aquestes malalties per tal de poder distingir els casos que tenen un origen infeccios (malaltia de Creutzfeldt-Jakob iatrogènica i nova variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob) dels que no tenen origen infeccios (formes familiars i formes esporàdiques)<sup>325,326</sup>.

Només una identificació adequada de les formes d'EET humanes que tenen origen infeccios permetrà orientar la recerca de la possible font d'infecció, i un cop identificada aquesta actuar en conseqüència per tal d'evitar noves infeccions a partir d'aquesta mateixa font<sup>327,328</sup>.

És evident que, tot i que els avenços produïts en els últims anys en els coneixements dels patrons de transmissió de les EET humanes d'origen infeccios han estat grans, encara hi ha un important desconeixement d'aspectes clau<sup>329,330</sup>.

Tanmateix, ateses les característiques de letalitat i transmissibilitat de les EET humanes d'origen infeccios, està plenament justificat que les administracions sanitàries realitzin una recollida sistemàtica de totes aquelles dades que permetin en primer lloc fer un seguiment de l'evolució d'aquests processos i en segon lloc incrementar-ne els coneixements.

Els procediments que se segueixen a diferents països per fer vigilància d'aquestes malalties no són exactament els mateixos.

Així, hi ha països que classifiquen els casos per any de diagnòstic i altres per any de defunció. Moltes vegades el diagnòstic definitiu es té amb la necròpsia i, per tant, coincideixen ambdues dates, però en alguns casos no, i això pot dificultar en certa manera les comparacions<sup>331,332</sup>.

Potser més importants que aquestes diferències són les que s'estableixen entre els registres dels diferents països segons que s'hi incloguin casos amb quadre clínic sospitos, casos amb EEG característic o que s'hi incloguin només els casos confirmats.

Hi ha països que inclouen en el registre només els casos en què en el certificat de defunció consta el diagnòstic de la malaltia. Com que algunes malalties neurològiques degeneratives (per exemple, l'Alzheimer) poden ser confoses amb la malaltia de Creutzfeldt-Jakob, sempre que no s'hagi realitzat el diagnòstic *post mortem* pot haver-hi una classificació incorrecta dels casos i, en conseqüència, hi haurà inexactitud en l'estimació de la incidència.

D'altra banda, en països o regions on, pel fet de tenir poca població, el nombre de casos anuals és baix, la incidència dels anys en què hi ha casos pot arribar a ser dues o tres vegades superior a la que calia esperar<sup>333,334</sup>.

Aquest és el cas de Luxemburg, país amb 387.000 habitants, en què un sol cas a l'any es tradueix en una taxa de 2,5 per milió d'habitants.

El volum de la població exposada i susceptible a l'agent de l'EEB no es coneix ni al Regne Unit ni tampoc en altres països on s'hagi importat d'aquest país animals bovins vius o els derivats alimentaris. Per tant, són moltes les incerteses sobre el període d'incubació de la nova variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob i és difícil fer previsions de l'extensió i abast de l'epidèmia en els humans per a les properes dècades.

Si el període d'incubació és de 10 a 15 anys, els primers casos de nova variant apareguts el 1995 s'haurien infectat a començaments de la dècada dels 80, en què l'epidèmia de l'EEB al Regne Unit encara no s'havia manifestat. En aquest supòsit, l'increment de persones exposades a teixits contaminats es podria traduir en un increment de casos de nova variant paral·lel al de l'epidèmia d'EEB.

En el supòsit que el període d'incubació sigui de 5 a 10 anys en lloc de 10 a 15, els casos d'infecció humana haurien començat en l'última meitat de la dècada dels 80, quan l'exposició a l'EEB era màxima; llavors l'epidèmia de nova variant d'MCJ seria petita, a causa de les mesures adoptades de 1987 a 1997 amb l'objectiu d'eliminar tant l'exposició animal com l'humana a l'EEB<sup>330</sup>.

Aquests diferents escenaris que es poden dibuixar segons que s'assumeixi un període d'incubació o un altre justifiquen que els resultats de les prediccions sobre l'epidèmia fetes amb models matemàtics siguin tan diferents, i que oscil·lin entre un centenar i milers de casos de nova variant<sup>335</sup>.

A més, la transmissió iatrogènica persona a persona de la nova variant és teòricament possible i, per tant, les persones ja infectades i aparentment sanes (és a dir, que es troben en període d'incubació) es poden sotmetre a procediments mèdics i quirúrgics amb una proporció idèntica a la de la població no infectada. Per tant, és possible que l'exposició a l'agent de la nova variant també s'incrementi.

Fins i tot s'ha plantejat que la quantitat i distribució de l'agent infeccios en els teixits de les persones afectades per la nova variant sigui diferent a la de les persones afectades per altres formes d'MCJ, amb la qual cosa el risc de donar lloc a nous casos iatrogènics seria superior per a la nova variant.

Tots aquests plantejaments teòrics, encara que discutibles precisament pel desconeixement que hi ha respecte a l'impacte real que poden tenir, fan que hi hagi acord en el fet que és necessari incrementar la vigilància epidemiològica de totes les formes d'encefalopaties espongiformes transmissibles humanes si es vol conèixer realment la magnitud de l'epidèmia de la nova variant<sup>325,336</sup>.

### **5.3.1. Vigilància de les EET en els humans a Catalunya**

En l'àmbit de l'Estat espanyol, l'any 1995 es va iniciar la vigilància de l'MCJ mitjançant un registre estatal en què es recollien tots els casos probables i confirmats des de l'any 1993.

Els neuròlegs i neuropatòlegs notificaven de manera voluntària al Centre Nacional d'Epidemiologia del Ministeri de Sanitat i Consum els casos de malaltia que diagnosticaven.

La publicació el 1996 dels primers casos de la nova variant de l'MCJ va mostrar una nova dimensió del problema d'aquesta patologia. Davant d'aquesta nova situació, el 1997 el Departament de Sanitat i Seguretat Social de la Generalitat de Catalunya es va fer càrrec de la gestió del registre de l'MCJ a Catalunya i a més va iniciar un programa de vigilància activa de la malaltia<sup>337</sup>. Va distribuir a tots els hospitals de Catalunya les

Taula 29. Mortalitat per EET humanes a Catalunya (període 1993-juliol 1997)

Any	Esporàdic	Familiar	Iatrogènic	vMCJ	Total
1993	1	–	1	–	2
1994	3	1	–	–	4
1995	–	–	–	–	0
1996	1	–	–	–	1
1997*	–	–	–	–	0
Total	5	1	1	–	7

\*Fins al juliol de 1997.

Casos confirmats i probables (Criteris Budka).

definicions de cas sospitós, probable i confirmat, i es va demanar la seva col·laboració perquè totes les sospites fossin notificades. A més, periòdicament es contactava amb els especialistes que tenien capacitat per fer els diagnòstics i se'ls preguntava sobre l'existència de casos no declarats encara. D'aquesta manera, també quan es detectava un possible cas se'n feia un seguiment i s'arbitraven els mecanismes adequats per facilitar la realització de la necròpsia un cop es produís la defunció, sense que en cap cas suposés aquesta pràctica una despesa addicional per a la família.

Així, com a fruit d'aquesta vigilància activa es va incrementar tant el nombre de casos (no només prospectius, sinó també retrospectius) enregistrats a Catalunya com la proporció de casos confirmats. Les definicions de cas sospitós probable i confirmat d'EET humana utilitzades a l'actua-

Taula 30. Mortalitat per EET humanes a Catalunya (període 1993-novembre 2001)

Any	Esporàdic	Familiar	Iatrogènic	vMCJ	Total
1993	6	–	1	–	7
1994	5	1	–	–	6
1995	1	–	–	–	1
1996	5	–	–	–	5
1997	4	–	–	–	4
1998	1	1	–	–	12
1999	10	3	–	–	13
2000	10	2	–	–	9
2001*	9	–	–	–	9
Total	61	7	1	0	69

\*Fins al 30 de novembre de 2001.

Casos confirmats i probables (Criteris OMS).

litat ja s'han mostrat al capítol de diagnòstic. En les taules 29 i 30 es pot observar quina era la situació del registre transferit des del Centre Nacional d'Epidemiologia a la Generalitat de Catalunya l'any 1997 i quina és la situació el novembre de 2001.

Com es pot veure, no solament s'ha incrementat el nombre de casos durant els tres últims anys, sinó que també s'ha incrementat el nombre de casos corresponents al període 1993-1997.

En la línia d'augmentar els esforços per tal que la vigilància de les EET humanes sigui exhaustiva, l'any 2001 a Catalunya s'ha fet un altre pas: regular mitjançant decret el que fins llavors es feia de manera voluntària<sup>338</sup>. Així, el Decret 64/2001, de 20 de febrer, pel qual es regula la vigilància epidemiològica de les encefalopaties transmissibles humanes a Catalunya, determina l'obligatorietat que els neurolegs notifiquin al Departament de Sanitat i Seguretat Social els casos que compleixin els criteris clínics de cas possible, i que aportin dades identificatives del malalt i del metge que notifica la sospita.

Igualment, aquest Decret obliga que es notifiquin els resultats dels diferents estudis diagnòstics realitzats en vida. Atesa la importància que té el diagnòstic *post mortem* per a la classificació adequada dels casos i especialment per al diagnòstic de nova variant, l'esmentat Decret determina en el seu article 5 que, sempre que durant el seguiment de la malaltia no s'hagi arribat a un diagnòstic alternatiu, s'ha d'oferir a la família la possibilitat d'obtenir una confirmació del diagnòstic mitjançant l'estudi necròptic. El resultat d'aquest estudi necròptic s'ha de comunicar sempre al Departament de Sanitat i Seguretat Social.

Com que les EET humanes són malalties poc freqüents, aquests circuits de vigilància estan dissenyats per detectar tant les sospites inicials de nous casos de malaltia com el resultat de les proves diagnòstiques que es realitzin al llarg de la malaltia. El fet que es tracti de malalties poc freqüents permet fer-ne un control exhaustiu, que evidentment no es podria assumir amb altres processos. Això ens permet de ser optimistes respecte a l'exhaustivitat futura del registre a Catalunya.

En qualsevol cas, com correspon fer sempre amb els sistemes de vigilància, caldrà fer un seguiment molt acurat de la seva efectivitat i anar-ne adequant els objectius i procediments a les noves situacions que es puguin plantejar.

L'Ordre del Ministeri de Sanitat i Consum de 21 de febrer de 2001 obliga les comunitats autònomes a trametre mensualment la informació recollida sobre nous casos al Registre nacional, gestionat pel Centre Nacional d'Epidemiologia<sup>339</sup>.



## Bibliografia

1. Hadlow WJ. Neuropathology and the scrapie-kuru connection. *Brain Pathol* 1995; 5: 27-32.
2. Wells GAH, Wilesmith JW. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol* 1995; 5: 91-103.
3. De Armond SJ, Prusiner SB. Prion diseases. A: Graham DI, Lantos PL, editors. *Greenfield's Neuropathology*. Londres: Arnold, 1997; 2: 235-80.
4. De Armond SJ, Prusiner SB. Molecular neuropathology of prion diseases. A: Rosenberg RN, Prusiner SB, Di Mauro S, Barchi RL, editors. *The molecular and genetic basis of neurological disease*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997: 145-63.
5. Prusiner SB. Cell biology and transgenic models of prion diseases. A: Collinge J, Palmer MS, editors. *Prion diseases*. Oxford: Oxford University Press, 1997: 130-62.
6. Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 1997; 278: 245-51.
7. Prusiner SB. Biology of prions. A: Rosenberg RN, Prusiner SB, Di Mauro S, Barchi RL, editors. *The molecular and genetic basis of neurological disease*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997: 103-43.
8. Prusiner SB. The prion diseases of human and animals. A: Rosenberg RN, Prusiner SB, Di Mauro S, Barchi RL, editors. *The molecular and genetic basis of neurological disease*. Boston: Butterworth-Heinemann, 1997: 165-86.
9. Caughey B, Chesebro B. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends Cell Biol* 1997; 7: 56-62.
10. Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature* 1997; 389: 795-8.
11. Collinge J, Palmer MS. Human prion diseases. A: Collinge J, Palmer MS, editors. *Prion diseases*. Nova York: University Press Inc, 1997: 18-56.
12. McLean CA, Ironside JW, Alpers MP, Brown PW, Cervenakova L, Anderson RM et al. Comparative neuropathology of kuru with the new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: evidence for strain of agent predominating over genotype of host. *Brain Pathol* 1998; 8: 429-37.
13. Masters CL, Gajdusek DC. The spectrum of Creutzfeldt-Jakob disease and the virus-induced subacute spongiform encephalopathies. A: Thomas Smith W, Cavanagh JB, editors. *Advances in Neuropathology*. Edimburg: Churchill Livingstone, 1982: 139-43.
14. Beck E, Daniel PM. Neuropathology of transmissible spongiform encephalopathies. A: Prusiner SB, McKinley MP, editors. *Prions: Novel infectious pathogens causing scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease*. Orlando: Academic Press, 1987: 331-85.

15. Lantos PL. From slow virus to prion: a review of transmissible spongiform encephalopathies. *Histopathology* 1992; 20: 1-11.
16. Bell JE, Ironside JW. Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *Brit Med Bull* 1993; 49: 738-77.
17. De Armond SJ, Prusiner SB. Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol* 1995; 146: 785-811.
18. Ironside JW. Review: Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Pathol* 1996; 6: 379-88.
19. Ironside JW, Bell JE. Pathology of prion diseases. A: Collinge J, Palmer MS, editors. *Prion Diseases*. Oxford: Oxford University Press, 1997: 55-88.
20. El Hachimi KH, Chaunu MP, Brown P, Foncin JF. Modifications of oligodendroglial cells in spongiform encephalopathies. *Exp Neurol* 1998; 154: 23-30.
21. Chou SM, Payne WN, Gibbs CJ, Gajdusek DC. Transmission and scanning electron microscopy of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 1980; 103: 885-904.
22. Landis DM, Williams RS, Masters CL. Golgi and electronmicroscopic studies of spongiform encephalopathy. *Neurology* 1981; 31: 538-49.
23. Liberski PP, Yanagihara R, Asher DM, Gibbs CJ, Gajdusek DC. Reevaluation of the ultrastructural pathology of experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 1990; 113: 121-37.
24. Suenaga T, Hirano A, Llana JF, Ksiezak-Reding H, Yen SH, Dickson DW. Ubiquitin immunoreactivity in kuru plaques in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1990; 28: 174-7.
25. Cammarata S, Tabaton M. Ubiquitin-reactive axons have a widespread distribution and are unrelated to prion protein plaques in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Sci* 1992; 110: 32-6.
26. Ferrer I, Costa F, Grau Veciana JM. Creutzfeldt-Jakob disease: a Golgi study. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1981; 7: 237-42.
27. Hogan RN, Baringer JR, Prusiner SB. Scrapie infection diminishes spines and increases varicosities of dendrites in hamsters: a quantitative Golgi analysis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1987; 46: 461-73.
28. Ferrer I, Kulisevski J, Vázquez J, González G, Pineda M. Purkinje cells in degenerative diseases of the cerebellum and its connections: a Golgi study. *Clin Neuropathol* 1988; 7: 237-42.
29. Berciano J, Berciano MT, Polo JM, Fígols J, Ciudad J, Lafarga M. Creutzfeldt-Jakob disease with severe involvement of cerebral white matter and cerebellum. *Virchows Arch* 1990; 417: 533-8.
30. Kitamoto T, Doh-ura K, Muramoto T, Miyazono M, Tateishi J. The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system. *Am J Pathol* 1992; 141: 271-2.
31. Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T et al. Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of

- the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol* 1992; 140: 1285-94.
32. Jeffrey M, Fraser JR, Halliday WG, Fowler N, Goodsir CM, Brown DA. Early unsuspected neuron and axon terminal loss in scrapie-infected mice revealed by morphometry and immunocytochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1995; 21: 41-9.
  33. Ferrer I, Ribera R, Blanco R, Martí E. Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 92-100.
  34. Ferrer I, Puig B, Blanco R, Martí E. Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience* 2000; 97: 715-26.
  35. Ferrer I, Casas R, Rivera R. Parvalbumin-immunoreactive cortical neurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1993; 34: 864-6.
  36. Guentchev M, Hainfellner JA, Trabattoni GR, Budka H. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 1119-24.
  37. Guentchev M, Groschup MH, Kordek R, Liberski PP, Budka H. Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathol* 1998; 8: 615-23.
  38. Guentchev M, Voigtländer T, Haberler C, Groschup MH, Budka H. Evidence for oxidative stress in experimental prion disease. *Neurobiol Dis* 2000; 7: 270-3.
  39. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-44.
  40. Prusiner SB. Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol* 1989; 43: 345-74.
  41. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515-22.
  42. Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS. Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 1991; 30: 7672-80.
  43. Prusiner SB. Transgenic investigations of prion diseases of humans and animals. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci* 1993; 339: 239-54.
  44. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10962-6.
  45. Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2310-4.
  46. Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A et al. Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 1989; 274: 1-13.

47. Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, De Armond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 1986; 122: 1-5.
48. Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 1995; 14: 509-17.
49. Van Keulen LJ, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME et al. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* 1995; 32: 299-308.
50. Brown DR, Besinger A, Herms JW, Kretzschmar HA. Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* 1998; 9: 1425-9.
51. Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC et al. Cellular isoform of the scrapie agent participates in lymphocyte activation. *J Virol* 1994; 68: 2383-7.
52. McBride PA, Eikelenboom P, Kraal G, Fraser H, Bruce ME. PrP protein is associated with follicular dendritic cells of spleens and lymph nodes in uninfected and scrapie-infected mice. *J Pathol* 1992; 168: 413-8.
53. Brown DR, Schmidt B, Groschup MH, Kretzschmar HA. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol* 1998; 75: 29-37.
54. Caughey B, Race RE, Chesebro B. Detection of prion protein mRNA in normal and scrapie-infected tissues and cell lines. *J Gen Virol* 1988; 69: 711-6.
55. Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF et al. Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* 1999; 289: 1163-78.
56. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, De Armond SJ et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356: 577-82.
57. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 1994; 8: 121-7.
58. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rülicke T et al. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 1996; 380: 639-42.
59. Collinge J, Whittington MA, Sidle KCL, Smith J, Palmer MS, Clarke AR et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994; 370: 295-7.
60. Herms JW, Kretzschmar HA, Titz S, Keller BU. Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur J Neurosci* 1995; 12: 2508-12.
61. Lledó PM, Tremblay P, De Armond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2403-7.
62. Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca<sub>2</sub>-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci Lett* 1996; 209: 49-52.

63. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T et al. Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 1996; 380: 528-31.
64. Klein MA, Aguzzi A. The neuroimmune interface in prion diseases. *News Physiol Sci* 2000; 15: 250-4.
65. Westaway D, De Armond SJ, Cayetano-Canlas J, Groth D, Foster D, Yang SL et al. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 1994; 76: 117-29.
66. Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 207: 621-9.
67. Miura T, Hori-i A, Takeuchi H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* 1996; 396: 248-52.
68. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 1997; 390: 684-7.
69. Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochem* 1998; 37: 7185-93.
70. Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 221-30.
71. Harrison MD, Jones CE, Solioz M, Dameron CT. Intracellular copper routing: the role of copper chaperones. *Trends Biochem Sci* 2000; 25: 29-32.
72. Wong BS, Vénien-Bryan C, Williamson RA, Burton DR, Gambetti P, Sy MS et al. Copper refolding of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276: 1217-24.
73. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40: 735-46.
74. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, Groth DF et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986; 46: 417-28.
75. Loch C, Chesebro B, Race R, Keith JM. Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 6372-6.
76. Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, De Armond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 1986; 5: 315-24.
77. Prusiner SB, Scott MR. Genetics of prions. *Annu Rev Genet* 1997; 31: 139-75.
78. Known point variations in human prion gene coding region. Nov 2000. <[http://www.mad-cow.org/prion\\_point\\_mutations.html](http://www.mad-cow.org/prion_point_mutations.html)>
79. Palmer MS, Mahal SP, Campbell TA, Hill AF, Sidle KC, Laplanche JL et al. Deletions in the prion protein gene are not associated with CJD. *Hum Mol Genet* 1993; 5: 541-4.

80. Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993; 73: 1339-47.
81. Sailer A, Büeler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 1994; 77: 967-8.
82. Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* 1994; 5: 2057-60.
83. Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 1996; 379: 339-43.
84. Fischer M, Rülcke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 1996; 15: 1255-64.
85. Race RE, Priola SA, Bessen RA, Ernst D, Dockter J, Rall GF et al. Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* 1995; 15: 1183-91.
86. Kitamoto T, Muramoto T, Mohri S, Doh-ura K, Tateishi J. Abnormal isoform of prion protein accumulates in follicular dendritic cells in mice with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 1991; 65: 6292-5.
87. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H et al. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997; 390: 687-90.
88. Klein MA, Frigg R, Raeber AJ, Flechsig E, Hegyi I, Zinkernagel RM et al. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nature Med* 1998; 4: 1429-33.
89. Raeber AJ, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A, Bessen RA et al. Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J* 1997; 16: 6057-65.
90. Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 2000; 408: 479-83.
91. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1996; 380: 345-7.
92. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* 1996; 18: 59-67.
93. Brown DR. Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 1105-13.
94. Diedrich JF, Bendheim PE, Kim YS, Carp RI, Haase AT. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 375-9.
95. Eklund CM, Kennedy RC, Hadlow WJ. Pathogenesis of scrapie virus infection in the mouse. *J Infect Dis* 1967; 117: 15-22.
96. Jendroska K, Heinzel FP, Torchia M, Stowring L, Kretzschmar HA, Kon A et al. Proteinase-resistant prion protein accumulation in Syrian hamster brain cor-

- relates with regional pathology and scrapie infectivity. *Neurology* 1991; 41: 1482-90.
97. De Armond SJ, Kristensson K, Bowler RP. PrP<sup>Sc</sup> causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox. *Prog Brain Res* 1992; 94: 437-46.
  98. Campbell IL, Eddleston M, Kemper P, Oldstone MB, Hobbs MV. Activation of cerebral cytokine gene expression and its correlation with onset of reactive astrocyte and acute-phase response gene expression in scrapie. *J Virol* 1994; 68: 2383-7.
  99. Williams AE, Lawson LJ, Perry VH, Fraser H. Characterization of microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 47-55.
  100. Williams AE, van Dam AM, Man-A-Hing WK, Berkenbosch F, Eikelenboom P, Fraser H. Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res* 1994; 654: 200-6.
  101. Kim JI, Ju WK, Choi JH, Choi EK, Carp RI, Wisniewski HM et al. Expression of cytokine genes and increased nuclear factor-kappa B activity in the brains of scrapie-infected mice. *Mol Brain Res* 1999; 73: 17-27.
  102. Betmouni S, Perry VH, Gordon JL. Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* 1996; 74: 1-5.
  103. Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M. PrP deposition, microglial activation and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* 1997; 144: 433-8.
  104. Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 1998; 8: 449-57.
  105. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. A prion protein fragment primes type 1 astrocytes to proliferation signals from microglia. *Neurobiol Dis* 1998; 4: 410-22.
  106. Collinge J, Sidle K, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1996; 383: 685-90.
  107. Borchelt DR, Koliatsos VE, Guarnieri M, Pardo CA, Sisodia SS, Price DL. Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous system. *J Biol Chem* 1994; 269: 14711-4.
  108. Fraser H, Dickinson AG. Targeting of scrapie lesions and spread of agent via the retino-tectal projection. *Brain Res* 1985; 346: 32-8.
  109. Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O. Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *CR Acad Sci III* 1995; 318: 339-44.
  110. Salès N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 2464-71.
  111. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999; 15: 8866-75.

112. Haeberlé AM, Ribaut-Barassin C, Bombarde G, Mariani J, Hunsmann G, Grassi J et al. Synaptic prion protein immunoreactivity in the rodent cerebellum. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 66-77.
113. Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V. Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 76-88.
114. Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci* 2001; 24: 85-90.
115. Bruce ME, McBride PA, Farquhar CF. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett* 1989; 102: 1-6.
116. De Armond SJ, Mobley WC, De Mott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 1987; 37: 1271-80.
117. Clinton J, Forsyth C, Royston MC, Roberts GW. Synaptic degeneration is the primary neuropathological feature in prion disease: a preliminary study. *Neuroreport* 1993; 4: 65-8.
118. Jeffrey M, Halliday WG. Numbers of neurons in vacuolated and non-vacuolated neuroanatomical nuclei in bovine spongiform encephalopathy-affected brains. *J Comp Pathol* 1994; 110: 287-94.
119. Jeffrey M, Goodsir CM, Bruce ME, McBride PA, Farquhar C. Morphogenesis of amyloid plaques in 87V murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1994; 20: 535-42.
120. Kristensson K, Feuerstein B, Taraboulos A, Hyun WC, Prusiner SB, De Armond SJ. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology* 1993; 43: 2335-41.
121. Müller WEG, Ushijima H, Schröder HC, Forrest JMS, Schatton WHFH, Rytic PG et al. Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrP<sup>Sc</sup>): Induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 1993; 246: 261-7.
122. Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1993; 362: 543-6.
123. Brown DR, Herms JW, Schmidt B, Kretzschmar HA. Different requirements for the neurotoxicity of fragments PrP and beta-amyloid. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1162-9.
124. Brown DR, Pitschke M, Riesner D, Kretzschmar HA. Cellular effects of a neurotoxic prion protein peptide are related to its beta-sheet configuration. *Neurosci Res Commun* 1998; 23: 119-28.
125. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein fragment interacts with PrP-deficient cells. *J Neurosci Res* 1998; 52: 260-7.
126. Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 1998; 334: 423-9.



127. Ovadia H, Rosenmann H, Shezen E, Halimi M, Ofran I, Gabizon R. Effect of scrapie infection on the activity of neuronal nitric-oxide synthase in brain and neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 16856-61.
128. Keshet GI, Ovadia H, Taraboulos A, Gabizon R. Scrapie-infected mice and PrP knockout mice share abnormal localization and activity of neuronal nitric oxide synthase. *J Neurochem* 1999; 72: 1224-31.
129. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 1997; 146: 104-12.
130. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J Neurochem* 1998; 70: 1686-93.
131. Choi SI, Ju WK, Choi EK, Kim J, Lea HZ, Carp RI et al. Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent. *Acta Neuropathol* 1998; 96: 279-86.
132. Milhavel O, McMahon HE, Rachidi W, Nishida N, Katamine S, Mangé A et al. Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 13937-42.
133. Wong BS, Pan T, Liu T, Li R, Gambetti P, Sy MS. Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273: 136-9.
134. Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol* 1995; 5: 213-21.
135. Lucassen PJ, Williams A, Chung WC, Fraser H. Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett* 1995; 198: 185-8.
136. Gray F, Delisle MB, Vital A, Wingerstmann L, Julien J, Géraud G et al. Neuronal apoptosis in human prion diseases. *Brain Pathol* 1997; 7: 1268.
137. Dorandeu A, Wingerstmann L, Chrétien F, Delisle MB, Vital C, Parchi P et al. Neuronal apoptosis in fatal familial insomnia. *Brain Pathol* 1998; 8: 531-7.
138. Ferrer I. Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol* 1999; 97: 5-12.
139. Puig B, Ferrer I. Cell death signaling in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol* 2001; 102: 207-15.
140. Hadlow WJ, Kennedy RC, Race RE. Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 1982; 146: 657-64.
141. Schreuder BE. Animal spongiform encephalopathies-an update. Part I. Scrapie and lesser known animal spongiform encephalopathies. *Vet Q* 1994; 16: 174-81.
142. García de Jalón JA, de las Heras M, Balaguer L, Badiola JJ. Enfermedad del prurigo lumbar (scrapie) en la oveja. Diagnóstico en cinco rebaños. *Med Vet* 1984; 4: 303-12.
143. Hartough GR, Burger D. Encephalopathy of mink. I. Epizootologic and clinical observations. *J Infect Dis* 1965; 115: 387-92.

144. Spraker TR, Miller MW, Williams ES, Getzy DM, Adrian WJ, Schoonveld GG et al. Spongiform encephalopathy in free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) and Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) in north-central Colorado. *J Wildl Dis* 1997; 33: 1-6.
145. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* 1987; 121: 419-20.
146. Schreuder BE. Animal spongiform encephalopathies-an update. Part II. Bovine spongiform encephalopathy. *Vet Q* 1994; 16: 182-92.
147. Gruffydd-Jones TJ, Galloway PE, Pearson GR. Feline spongiform encephalopathy. *J Small Anim Pract* 1991; 33: 471-6.
148. Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA, Wilesmith JW. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec* 1991; 129: 233-6.
149. Willoughby K, Kelly DF, Lyon DG, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a captive puma (*Felis concolor*). *Vet Rec* 1992; 131: 431-4.
150. Pearson GR, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ, Hope J, Chong A, Higgins RJ et al. Feline spongiform encephalopathy: fibril and PrP studies. *Vet Rec* 1992; 131: 307-10.
151. Bons N, Mestre-Frances N, Charnay Y, Salmona M, Tagliavini F. Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *CR Acad Sci III* 1996; 319: 733-6.
152. Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* 1988; 123: 638-44.
153. Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec* 1991; 128: 199-203.
154. Kimberlin RH. Encefalopatía bovina espongiiforme. *Rev Sci Tech OIE* 1992; 11: 441-89.
155. Van Keulen LJ, Langeveld JP, Garssen GJ, Jacobs JG, Schreuder BE, Smits MA. Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy: a review. *Vet Q* 2000; 22: 197-200.
156. Wells GA, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec* 1989; 125: 521-4.
157. Fontaine JJ, Parodi AL. Lésions et diagnostic histopathologique de l'encéphalopathie spongiforme bovine. *Point Vet* 1991; 22: 721-32.
158. Simmons MM, Harris P, Jeffrey M, Meek SC, Blamire IW, Wells GA. BSE in Great Britain. Consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec* 1996; 138: 175-7.
159. Hadlow WJ. Reflections on the transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Pathol* 1999; 36: 523-9.

160. Ryder SJ, Hawkins SA, Dawson M, Wells GA. The neuropathology of experimental bovine spongiform encephalopathy in the pig. *J Comp Pathol* 2000; 122: 131-43.
161. Manuelidis L, Fritch W, Xi YG. Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* 1997; 277: 94-8.
162. Pozzato N, De las Heras M, García de Jalón JA. Diagnóstico del scrapie ovino mediante la detección de fibrillas asociadas al scrapie (SAF). *Med Vet* 1996; 13: 345-8.
163. Schelcher F, Delverdier M, Cabanie P, Valarcher JF, Espinasse J. La tremblante des ovins et des caprins: diagnostic contrôle en élevage. *Point Vet* 1991; 22: 21-7.
164. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218: 1309-11.
165. Merz PA, Rohwer RG, Kascsak R, Wisniewski HM, Somerville RA, Gibbs CJ Jr et al. Infection-specific particle from the unconventional slow virus diseases. *Science* 1984; 225: 437-40.
166. Stack MJ, Chaplin MJ, Aldrich AM, Davis LA. The distribution of scrapie-associated fibrils in neural and non-neural tissues of advanced clinical cases of natural scrapie in sheep. *Res Vet Sci* 1998; 64: 141-6.
167. Salazar AM, Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Syndromes of amyotrophic lateral sclerosis and dementia: relation to transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1983; 14: 17-26.
168. Brown P, Gibbs CJ Jr, Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A et al. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 1994; 35: 513-29.
169. Brown P, Rodgers-Johnson P, Cathala F, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Creutzfeldt-Jakob disease of long duration: clinicopathological characteristics, transmissibility, and differential diagnosis. *Ann Neurol* 1984; 16: 295-304.
170. Kretzschmar HA, Ironside JW, De Armond SJ, Tateishi J. Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1996; 53: 913-20.
171. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996; 39: 767-78.
172. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46: 224-33.
173. Wehl CC, Roos RP. Creutzfeldt-Jakob disease, new variant Creutzfeldt-Jakob disease, and bovine spongiform encephalopathy. *Neurol Clin* 1999; 17: 835-59.
174. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347: 921-5.

175. Zeidler M, Sellar RJ, Collie DA, Knight R, Stewart G, Macleod MA et al. The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 2000; 355: 1412-8.
176. Hill AF, Butterworth RJ, Joiner S, Jackson G, Rossor MN, Thomas DJ et al. Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 1999; 353: 183-9.
177. Spudich S, Mastrianni JA, Wrensch M, Gabizon R, Meiner Z, Kahana I et al. Complete penetrance of Creutzfeldt-Jakob disease in Libyan Jews carrying the E200K mutation in the prion protein gene. *Mol Med* 1995; 1: 607-13.
178. Zerr I, Giese A, Windl O, Kropp S, Schulz-Schaeffer W, Riedemann C et al. Phenotypic variability in fatal familial insomnia (D178N-129 M) genotype. *Neurology* 1998; 51: 1398-405.
179. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 1986; 315: 997-1003.
180. Medori R, Tritschler HJ. Prion protein gene analysis in three kindreds with fatal familial insomnia (FFI): codon 178 mutation and codon 129 polymorphism. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 822-7.
181. Gambetti P, Parchi P, Petersen RB, Chen SG, Lugaresi E. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: clinical, pathological and molecular features. *Brain Pathol* 1995; 5: 43-51.
182. Mastrianni JA, Nixon R, Layzer R, Telling GC, Han D, De Armond SJ et al. Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N Engl J Med* 1999; 340: 1630-8.
183. Parchi P, Capellari S, Chin S, Schwarz HB, Schechter NP, Butts JD et al. A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology* 1999; 52: 1757-63.
184. Ghetti B, Dlouhy SR, Giaccone G, Bugiani O, Frangione B, Farlow MR et al. Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease and the Indiana kindred. *Brain Pathol* 1995; 5: 61-75.
185. Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Preclinical test for prion diseases. *Nature* 1996; 381: 563.
186. Schreuder BE, van Keulen LJ, Vromans ME, Langeveld JP, Smits MA. Tonsillar biopsy and PrPsc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec* 1998; 142: 564-8.
187. Jones V, Martin TC, Keyes P, Dawson M. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE-affected cattle. *Vet Rec* 1996; 139: 360-3.
188. Lee KH, Harrington MG. 14-3-3 and BSE. *Vet Rec* 1997; 140: 206-7.
189. Moynagh J, Schimmel H. Test for BSE evaluated. *Bovine spongiform encephalopathy. Nature* 1999; 400: 105.
190. Fischer MB, Roeckl C, Parizek P, Schwarz HP, Aguzzi A. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 2000; 408: 479-83.

191. Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med* 2001; 7: 361-4.
192. Harrington MG, Merrill CR, Asher DM, Gajdusek DC. Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 279-83.
193. Hsich G, Kenney K, Gibbs CJ, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1996; 335: 924-30.
194. Zerr I, Bodemer M, Gefeller O, Otto M, Poser S, Wiltfang J et al. Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid supports the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1998; 43: 32-40.
195. Sáiz A, Graus F, Dalmau J, Pifarré A, Marín C, Tolosa E. Detection of 14-3-3 brain protein in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Ann Neurol* 1999; 46: 774-7.
196. Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RS et al. Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2000; 55: 811-5.
197. Masters CL, Harris JO, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr, Bernoulli C, Asher DM. Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol* 1979; 5: 177-88.
198. WHO. Human transmissible spongiform encephalopathies. *Wkly Epidemiol Rec* 1998; 73: 361-72.
199. Sáiz A, Marín C, Tolosa E, Graus F. Utilidad diagnóstica de la determinación de la proteína 14-3-3 en el líquido cefalorraquídeo en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. *Neurología* 1998; 13: 324-8.
200. Brown P, Preece M, Brandel JP, Sato T, McShane L, Zerr I et al. Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease at the millennium. *Neurology* 2000; 55: 1075-81.
201. Brandel JP, Peoc'h K, Beaudry P, Welaratne A, Bottos C, Agid Y et al. 14-3-3 protein cerebrospinal fluid detection in human growth hormone-treated Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol* 2001; 49: 257-60.
202. Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, Cousens SN et al. Diagnosis of new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 2000; 47: 575-82.
203. Steinhoff BJ, Racker S, Herrendorf G, Poser S, Grosche S, Zerr I et al. Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1996; 53: 162-6.
204. Hoshi K, Yoshino H, Urata J, Nakamura Y, Yanagawa H, Sato T. Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts in Japan. *Neurology* 2000; 55: 718-21.
205. Billette de Villemeur T, Deslys JP, Pradel A, Soubrie C, Alperovitch A, Tardieu M et al. Creutzfeldt-Jakob disease from contaminated growth hormone extracts in France. *Neurology* 1996; 47: 690-5.

206. De Seze J, Hache JC, Vermersch P, Arndt CF, Maurage CA, Pasquier F et al. Creutzfeldt-Jakob disease: neurophysiologic visual impairments. *Neurology* 1998; 52: 962-7.
207. Finkenstaedt M, Szudra A, Zerr I, Poser S, Hise JH, Stoebner JM et al. MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease. *Radiology* 1996; 199: 793-8.
208. Bahn MM, Kido DK, Lin W, Pearlman AL. Brain magnetic resonance diffusion abnormalities in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1997; 54: 1411-5.
209. Vrancken AF, Frijns CJ, Ramos LM. FLAIR MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2000; 55: 147-8.
210. Bahn MM, Parchi P. Abnormal diffusion-weighted magnetic resonance images in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1999; 56: 577-83.
211. Na DL, Suh CK, Choi SH, Moon HS, Seo DW, Kim SE et al. Diffusion-weighted magnetic resonance imaging in probable Creutzfeldt-Jakob disease: a clinical-anatomic correlation. *Arch Neurol* 1999; 56: 951-7.
212. Zeidler M, Collie DA, Macleod MA, Sellar RJ, Knight R. FLAIR MRI in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2001; 56: 282.
213. García de Jalón JA. Origen y situación actual de las encefalopatías espongiiformes animales. Reunión internacional sobre enfermedades por priones. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco, 1999: 87-93.
214. Hunter N, Foster JD, Goldmann W, Stear MJ, Hope J, Bostock C. Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol* 1996; 141: 809-24.
215. Scientific Steering Committee. Scientific opinion on the policy of breeding and genotyping of sheep, I.E. The issue of whether sheep should be bred to be resistant to scrapie. Meeting of 22-23 July 1999.
216. Wilesmith JW, Ryan JB, Hueston WD. Bovine spongiform encephalopathy: case-control studies of calf feeding practices and meat and bonemeal inclusion in proprietary concentrates. *Res Vet Sci* 1992; 52: 325-31.
217. Información EEB de la Administración General del Estado. <<http://www.eeb.es>>
218. Hoinville LJ, Wilesmith JW, Richards MS. An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the «feed ban». *Vet Rec* 1995; 136: 312-8.
219. Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ et al. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 1996; 382: 779-88.
220. BSE testing. Cumulative table from January to May 2001. <[http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/bse/index\\_en.html](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/bse/index_en.html)>
221. Calavas D, Morignat E, Ducrot C. Programmes de surveillance active de l'ESB dans trois catégories de bovins à risque. Analyse des résultats. (2001). AFSSA-INRA.
222. Curnow RN, Hau CM. The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. *Vet Rec* 1996; 138: 407-8. <<http://www.afssa.fr>>

223. Donnelly CA. Maternal transmission of BSE: interpretation of the data on the offspring of BSE-affected pedigree suckler cows. *Vet Rec* 1998; 142: 579-80.
224. Palmer MS, Collinge J. Mutations and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum Mutat* 1993; 2: 168-73.
225. Wells GA, Hawkins SA, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI et al. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec* 1998; 142: 103-6.
226. Houston F, Foster JD, Chong A, Hunter N, Bostock CJ. Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 2000; 356: 999-1000.
227. Loftus B, Rogers M. Characterization of a prion protein (PrP) gene from rabbit; a species with apparent resistance to infection by prions. *Gene* 1997; 184: 215-9.
228. Fraser H, Bruce ME, Chree A, McConnell I, Wells GA. Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice. *J Gen Virol* 1992; 73: 1891-7.
229. MAFF. Spongiform Encephalopathy Advisory Committee. SEAC Meeting Public Summary. Surrey, England: UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1997.
230. Middleton DJ, Barlow RM. Failure to transmit bovine spongiform encephalopathy to mice by feeding them with extraneural tissues of affected cattle. *Vet Rec* 1993; 132: 545-7.
231. Taylor DM, Ferguson CE, Bostock CJ, Dawson M. Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Vet Rec* 1995; 136: 592-6.
232. Brewer MS. Bovine spongiform encephalopathy-food safety implications. *Adv Food Nutr Res* 2001; 43: 265-317.
233. Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of «Kuru» in the native population. *N Engl J Med* 1957; 257: 974-8.
234. Zigas V, Gajdusek DC. Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the eastern highlands of Australian New Guinea. *J Med Australia* 1957; ii: 745-54.
235. Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *Lancet* 1959; ii: 289-90.
236. Cuillé J, Chelle PL. La maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable? *C R Acad Sci Ser D* 1936; 203: 1552-4.
237. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966; 209: 794-6.
238. Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM et al. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 1968; 161: 388-9.
239. Gajdusek DC. Unconventional virus and the origin and disappearance of Kuru. *Science* 1977; 197: 943-60.
240. Prusiner SB, Gajdusek DC, Alpers MP. Kuru with incubation periods exceeding two decades. *Ann Neurol* 1982; 12: 1-9.

241. Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E et al. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. *Ann Neurol* 1998; 43: 763-7.
242. Will RG. Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease. *Br Med Bull* 1993; 49: 960-70.
243. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95: 13363-83.
244. Goldfarb LG, Mitrova E, Brown P, Toh BK, Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. *Lancet* 1990; 336: 514-5.
245. Goldfarb LG, Korczyn AD, Brown P, Chapman J, Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid precursor gene linked to Creutzfeldt-Jakob disease in Sephardic Jews of Libyan and non-Libyan origin. *Lancet* 1990; 336: 637-8.
246. CDC. Fatal degenerative neurological disease in patients who received pituitary-derived human growth hormone. *MMWR* 1985; 34: 359-60, 365-6.
247. CDC. Rapidly progressive dementia in a patient who received a cadaveric dura mater graft. *MMWR* 1987; 36: 49-50, 55.
248. Britton TC, al-Sarraj S, Shaw C, Campbell T, Collinge J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1155.
249. Bateman D, Hilton D, Love S, Zeidler M, Beck J, Collinge J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet* 1995; 346: 1155-6.
250. Brown P, Cathala F, Raubertas RF, Gajdusek DC, Castaigne P. The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 1987; 37: 895-904.
251. Cousens SN, Zeidler M, Esmonde TF, de Silva R, Wilesmith JW, Smith PG et al. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: analysis of epidemiological surveillance data for 1970-96. *BMJ* 1997; 315: 389-95.
252. Matthews WB. Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975; 38: 210-3.
253. Will RG, Matthews WB, Smith PG, Hudson C. A retrospective study of Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales 1970-79 II: epidemiology. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1986; 49: 749-55.
254. Cousens SN, Harries-Jones R, Knight R, Will RG, Smith PG, Matthews WB. Geographical distribution of cases of Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales 1970-84. *BMJ* 1990; 53: 459-65.
255. Raubertas RF, Brown P, Cathala F, Brown I. The question of clustering of Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Epidemiol* 1989; 129: 146-54.
256. d'Aignaux JH, Laplanche JL, Delasnerie-Lauprêtre N, Brandel JP, Peoc'h K, Salomon D et al. Trends in mortality from sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in France 1992-1997. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2000; 68: 787-9.
257. Kahana E, Alter M, Braham J, Sofer D. Creutzfeldt-Jakob disease: focus among Libyan Jews in Israel. *Science* 1974; 183: 90-1.
258. Mayer V, Orolin D, Mitrova E. Cluster of Creutzfeldt-Jakob disease and presenile dementia. *Lancet* 1977; ii: 256.



259. Gálvez S, Masters CL, Gajdusek DC. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in Chile. *Arch Neurol* 1980; 37: 11-4.
260. Neugut RH, Neugut AI, Kahana E, Stein Z, Alter M. Creutzfeldt-Jakob disease: familial clustering among Libyan-born Israelis. *Neurology* 1979; 29: 225-31.
261. Ferák V, Kroupová Z, Mayer V. Are population-genetic mechanisms responsible for clustering of cases of Creutzfeldt-Jakob disease? *BMJ* 1981; 282: 521-2.
262. Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D et al. Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1991; 324: 1091-7.
263. Brown P, Gálvez S, Goldfarb LG, Nieto A, Cartier L, Gibbs CJ Jr et al. Familial Creutzfeldt-Jakob disease in Chile is associated with the codon 200 mutation of the PRNP amyloid precursor gene on chromosome 20. *J Neurol Sci* 1992; 112: 65-7.
264. Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blättler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 1996; 347: 1181.
265. Cousens S, Smith PG, Ward H, Everington D, Knight RS, Zeidler M et al. Geographical distribution of variant Creutzfeldt-Jakob disease in Great Britain, 1994-2000. *Lancet* 2001; 357: 1002-7.
266. Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Collinge J et al. Tissue handling in suspected Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol* 1995; 5: 319-22.
267. Andrews NJ, Farrington CP, Cousens SN, Smith PG, Ward H, Knight RS et al. Incidence of variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 2000; 356: 481-2.
268. Will RG. Epidemiological surveillance of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom. *Eur J Epidemiol* 1991; 7: 460-5.
269. Montagna P, Cortelli P, Avoni P, Tinuper P, Plazzi G, Gallasi R et al. Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol* 1998; 8: 515-20.
270. CDC. Creutzfeldt-Jakob disease associated with cadaveric dura mater grafts –Japan, January 1979– May 1996. *MMWR* 1997; 46: 1066-9.
271. Brown P, Preece MA, Will RG. «Friendly fire» in medicine: hormones, homo-grafts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1992; 340: 24-7.
272. Duffy P, Wolf J, Collins G, De Voe AG, Streeten B, Cowen D. Possible person to person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1974; 290: 692-3.
273. Bernoulli C, Siegfried J, Baumgartner G, Regli F, Rabinowicz T, Gajdusek DC et al. Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* 1977; i: 478-9.
274. Will RG, Matthews WB. Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1982; 45: 235-8.
275. Thadani V, Penar PL, Partington J, Kalb R, Janssen R, Schonberger LB et al. Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. *J Neurosurg* 1988; 69: 766-9.

276. Powell-Jackson J, Weller RO, Kennedy P, Preece MA, Whitcombe EM, Newsom-Davis J. Creutzfeldt-Jakob disease after administration of human growth hormone. *Lancet* 1985; ii: 244-6.
277. Koch TK, Berg BO, De Armond SJ, Gravina RF. Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. *N Engl J Med* 1985; 313: 731-3.
278. Kondo K, Kuroiwa Y. A case-control study of Creutzfeldt-Jakob disease: association with physical injuries. *Ann Neurol* 1982; 11: 377-81.
279. Davanipour Z, Alter M, Sobel E, Asher DM, Gajdusek DC. Creutzfeldt-Jakob disease: possible medical risk factors. *Neurology* 1985; 35: 1483-6.
280. Harries-Jones R, Knight R, Will RG, Cousens S, Smith PG, Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease in England and Wales, 1980-1984: a case-control study of potential risk factors. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51: 1113-9.
281. Van Duijn CM, Delasnerie-Lauprêtre N, Masullo C, Zerr I, de Silva R, Wientjens DP et al. Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-1995. *Lancet* 1998; 351: 1081-5.
282. Collins S, Law MG, Fletcher A, Boyd A, Kaldor J, Masters CL. Surgical treatment and risk of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Lancet* 1999; 353: 693-7.
283. Wientjens DP, Davanipour Z, Hofman A, Kondo K, Matthews WB, Will RG et al. Risk factors for Creutzfeldt-Jakob disease: a reanalysis of case-control studies. *Neurology* 1996; 46: 1287-91.
284. Klein R. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 1993; 341: 768.
285. Créange A, Gray F, Cesaro P, Adle-Biassette H, Duvoux C, Cherqui D et al. Creutzfeldt-Jakob disease after liver transplantation. *Ann Neurol* 1995; 38: 269-72.
286. Patry D, Curry B, Easton D, Mastrianni JA, Hogan DB. Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) after blood product transfusion from a donor with CJD. *Neurology* 1998; 50: 1872-3.
287. Esmonde TF, Will RG, Slattery JM, Knight R, Harries-Jones R, de Silva R et al. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet* 1993; 341: 205-7.
288. Wilson K, Code C, Ricketts MN. Risk of acquiring Creutzfeldt-Jakob disease from blood transfusions: systematic review of case-control studies. *BMJ* 2000; 321: 17-9.
289. Heye N, Hensen S, Müller N. Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion. *Lancet* 1994; 343: 298-9.
290. Operskalski EA, Mosley JW. Pooled plasma derivatives and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1995; 346: 1224.
291. Brown P. Can Creutzfeldt-Jakob disease be transmitted by transfusion? *Current Opinion in Hematology* 1995; 2: 472-7.
292. Gibbs CJ Jr, Amyx HL, Bacote A, Masters CL, Gajdusek DC. Oral transmission of kuru, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie to nonhuman primates. *J Infect Dis* 1980; 142: 205-8.

293. Scott JR. Scrapie pathogenesis. *Br Med Bull* 1993; 49: 778-91.
294. Herzberg L, Herzberg BN, Gibbs CJ, Sullivan W, Amyx H, Gajdusek DC. Creutzfeldt-Jakob disease: hypothesis for high incidence in Libyan Jews in Israel. *Science* 1974; 186: 848.
295. Southwood Committee. Report of the working party on bovine spongiform encephalopathy. London: Department of Health and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, 1989: 405-9.
296. Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J et al. The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 1997; 389: 448-50.
297. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A et al. Transmissions to mice indicate that «new variant» CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389: 498-501.
298. Scott MR, Will R, Ironside J, Nguyen HO, Tremblay P, De Armond SJ et al. Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 15137-42.
299. Brown P. The risk of bovine spongiform encephalopathy («mad cow disease») to human health. *JAMA* 1997; 278: 1008-11.
300. Hill AF, Zeidler M, Ironside J, Collinge J. Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease by tonsil biopsy. *Lancet* 1997; 349: 99-100.
301. Hilton DA, Fathers E, Edwards P, Ironside JW, Zajicek J. Prion immunoreactivity in appendix before clinical onset of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1998; 352: 703-4.
302. Wadsworth JD, Joiner S, Hill AF, Campbell TA, Desbruslais M, Luthert PJ et al. Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeldt-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet* 2001; 358: 171-80.
303. Bruce ME, McConnell I, Will RG, Ironside JW. Detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease infectivity in extraneural tissues. *Lancet* 2001; 358: 208-9.
304. Taylor DM, Fraser H, McConnell I, Brown DA, Brown KL, Lamza KA et al. Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol* 1994; 139: 313-26.
305. Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1991; 337:1441-2.
306. Collinge J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1999, 354: 317-23.
307. Will RG, Zeidler M. Diagnosing Creutzfeldt-Jakob disease. *BMJ* 1996; 313: 833-84.
308. Advisory committee on dangerous pathogens. Spongiform encephalopathy advisory committee. Transmissible spongiform encephalopathies agents: safe working and the prevention of infection. London: HMSO, 1998.
309. Clarke MC, Haig DA. Presence of the transmissible agent of scrapie in the serum of affected mice and rats. *Vet Rec* 1967; 80: 504.
310. Field EJ, Caspary EA, Joyce G. Scrapie agent in blood. *Vet Rec* 1968; 83: 109-10.

311. Manuelidis EE, Gorgacs EJ, Manuelidis L. Viremia in experimental Creutzfeldt-Jakob disease. *Science* 1978; 200: 1069-71.
312. Kuroda Y, Gibbs CJ, Amyx HL, Gajdusek DC. Creutzfeldt-Jakob disease in mice: persistent viremia and preferential replication of virus in low-density lymphocytes. *Infect Immun* 1983; 41: 154-61.
313. Brown P, Cervenáková L, McShane LM, Barber P, Rubenstein R, Drohan WN. Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *Transfusion* 1999; 39: 1169-78.
314. Manuelidis EE, Kim JH, Mericangas JR, Manuelidis L. Transmission to animals of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood. *Lancet* 1985; 2: 896-7.
315. Tateishi J. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from human blood and urine into mice. *Lancet* 1985; 2: 1074.
316. Tamai Y, Kojima H, Kitajima R, Taguchi F, Ohtani Y, Kawaguchi T et al. Demonstration of the transmissible agent in tissue from a pregnant woman with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 1992; 327: 649.
317. Deslys JP, Lasmézas C, Dormont D. Selection of specific strains in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1994; 343: 848-9.
318. Ponchon T. Transmission of hepatitis C and prion diseases through digestive endoscopy: evaluation of risk and recommended practices. *Endoscopy* 1997; 29: 199-202.
319. WHO. Medicinal and other products in relation to human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1997; 75: 505-13.
320. Diring H, Braig HR. Infectivity of unconventional viruses in dura mater. *Lancet* 1989, 1: 439-40.
321. Brown P, Gibbs CJ, Gajdusek DC, Cathala F, La Bauge R. Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from formalin-fixed, paraffin-embedded human brain tissue. *N Engl J Med* 1986; 315: 1614-5.
322. Taylor DM, McConnell I. Autoclaving does not decontaminate formol-fixed scrapie tissues. *Lancet* 1988; i: 1463-4.
323. WHO. Public health issues related to animal and human spongiform encephalopathies: Memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1992; 70: 183-90.
324. Decret 300/1992, de 24 de novembre, d'ordenació de la gestió dels residus sanitaris. *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya* 1992; (1688): 7541-4.
325. Johnson RT, Gibbs CJ. Creutzfeldt-Jakob disease and related transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 1998; 339: 1994-2004.
326. Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E et al. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. *Ann Neurol* 1998; 43: 763-7.

327. Donnelly CA. Likely size of the French BSE epidemic. *Nature* 2000; 408: 787-8.
328. Hope J. Transmissible spongiform encephalopathies of man and animals. A: Krause RM. *Emerging infections*. San Diego: Academic Press, 2000: 447-61.
329. Balter M. Tracking the human fallout from «Mad cow disease». *Science* 2000; 289: 1452-3.
330. Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, Detwiler L. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution and current concerns. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 6-16.
331. Ghani AC, Ferguson NM, Donnelly CA, Anderson RM. Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature* 2000; 406: 583-4.
332. Stratton E. Human transmissible spongiform encephalopathies. *Can Commun Dis Rep* 1999; 25-1: 1-8.
333. Cousens S, Smith PG, Ward H, Everington D, Knight RSG, Zeidler M et al. Geographical distribution of variant Creutzfeldt-Jakob in Great Britain, 1994-2000. *Lancet* 2001; 357: 1002-7.
334. Cousens SN, Linsell L, Smith PG, Chandrakumar M, Wilesmith JW, Knight RSG et al. Geographical distribution of variant CJD in the UK (excluding Northern Ireland). *Lancet* 1999; 353: 18-21.
335. WHO. *Global Surveillance, Diagnosis and Therapy of Human Transmissible Spongiform Encephalopathies: Report of a WHO Consultation*. Ginebra: World Health Organization, 1998.
336. Krebs J. Beefing about the risks posed by the French BSE epidemic. *Nature* 2000; 408: 767.
337. Departament de Sanitat i Seguretat Social. Les encefalopaties espongiformes transmissibles humanes a Catalunya. *But Epidemiol Cat* 1999; XX: 49-51.
338. Decret 64/2001, de 20 de febrer, pel qual es regula la vigilància epidemiològica de les encefalopaties espongiformes transmissibles humanes. *Diari Oficial de la Generalitat de Catalunya* 2001; 3341: 3193-7.
339. Orden de 21 de febrero de 2001, por la que se regula la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica en relación con las encefalopatías transmisibles humanas. *Boletín Oficial del Estado* 2001; (52): 7676-7.

## Legislació

### Legislació comunitària

*Decisió de la Comissió (96/239/CE), de 27 de març*, per la qual s'adopten determinades mesures d'emergència en matèria de protecció contra l'encefalopatia espongiforme bovina (DOCE L 78 de 28-3-96). **Actualment derogada**

*Decisió del Consell (98/256/CE), de 16 de març*, relativa a les mesures d'emergència en matèria de protecció contra la BSE i per la qual es modifica la Decisió 94/474/CE i es deroga la Decisió 96/239/CE (DOCE L 113 de 15-4-98).

*Decisió de la Comissió 98/272/CE, de 23 d'abril*, relativa a la vigilància epidemiològica de les encefalopaties espongiformes transmissibles i per la qual es modifica la Decisió 94/474/CE (DOCE L 122 de 24-4-98).

*Decisió de la Comissió 98/351/CE, de 29 de maig*, per la qual, de conformitat amb l'apartat 5 de l'article 6 de la Decisió 98/256/CE del Consell, es fixa la data en què es podrà iniciar l'expedició des d'Irlanda del Nord de productes elaborats amb carn d'animals de l'espècie bovina en el marc del règim d'exportació del bestiar certificat (DOCE L 157 de 30-5-98).

*Decisió de la Comissió 98/564/CE, de 7 d'octubre*, per la qual es modifica la decisió 98/256/CE del Consell pel que fa a determinades mesures d'emergència en matèria de protecció contra l'encefalopatia espongiforme bovina (DOCE L 273 de 9-10-98).

*Decisió de la Comissió 98/653/CE, de 18 de novembre*, relativa a mesures d'emergència per fer front a la presència de casos d'encefalopatia espongiforme bovina a Portugal (DOCE L 311 de 20-11-98). **Actualment derogada**

*Decisió de la Comissió 98/692/CE, de 25 de novembre*, per la qual es modifica la Decisió 98/256/CE en relació amb determinades mesures d'emergència en matèria de protecció contra l'encefalopatia espongiforme bovina (DOCE L 328 de 4-12-98).

*Decisió de la Comissió 99/514/CE, de 23 de juliol*, per la qual es fixa la data en què, de conformitat amb l'apartat 5 de l'article 6 de la Decisió 98/256/CE, pot iniciar-se l'expedició des del Regne Unit de productes bovins d'acord amb el règim d'exportació basat en una data (DOCE L 195 de 28-7-99).

*Decisió de la Comissió 2000/374/CE, de 5 de juny*, per la qual es modifica la Decisió 98/272/CE relativa a la vigilància epidemiològica de les encefalopaties espongiformes transmissibles (DOCE L 135 de 8-6-00).

*Decisió de la Comissió 2000/418/CE, de 29 de juny, per la qual es regula l'ús dels materials de risc en relació amb les encefalopaties espongiformes transmissibles i es modifica la Decisió 94/474/CE (DOCE L 158 de 30-6-00). **Actualment derogada***

*Decisió de la Comissió 2000/764/CE, de 29 de novembre, relativa a la detecció de l'encefalopatia espongiforme bovina en els animals bovins i que modifica la Decisió 98/272/CE relativa a la vigilància epidemiològica de les encefalopaties espongiformes transmissibles (DOCE L 305 de 6-12-00).*

*Reglament CE núm. 2777/2000 de la Comissió, de 18 de desembre, pel qual s'adopten mesures excepcionals de suport al mercat de la carn de vacú (DOCE L 321 de 19-12-00).*

*Decisió de la Comissió 2001/2/CE, de 27 de desembre, que modifica la Decisió 2000/418/CE per la qual es regula l'ús dels materials de risc en relació amb les encefalopaties espongiformes transmissibles (DOCE L 1 de 4-1-01).*

*Decisió de la Comissió 2001/8/CE, de 29 de desembre, que modifica la Decisió 2000/764/CE relativa a la detecció de l'encefalopatia espongiforme bovina en els animals bovins i s'actualitza l'annex IV de la Decisió 98/272/CE relativa a la vigilància epidemiològica de les encefalopaties espongiformes transmissibles (DOCE L 2 de 5-1-01).*

*Reglament CE núm. 111/2001 de la Comissió, de 19 de gener, que modifica el Reglament CE núm. 2777/2000, pel qual s'adopten mesures excepcionals de suport al mercat de la carn de vacú (DOCE L 19 de 20-1-01).*

*Decisió de la Comissió 2001/376/CE, de 18 d'abril, relativa a les mesures exigides per l'aparició de casos d'encefalopatia espongiforme bovina a Portugal i a la implantació d'un règim d'exportació basat en la data (DOCE L 132 de 15-5-01).*

*Decisió de la Comissió 2001/233/CE, de 14 de maig, que modifica la Decisió 2000/418/CE en relació amb la carn i l'espina dels bovins separades mecànicament (DOCE L 84 de 23-3-01).*

*Decisió de la Comissió 2001/270/CE, de 29 de maig, per la qual es modifica la Decisió 2000/418/CE en relació amb les importacions procedents de països tercers (DOCE L 94 de 4-4-01).*

*Reglament CE núm. 999/2001 del Parlament Europeu i del Consell, de 22 de maig, pel qual s'estableixen disposicions per a la prevenció, el control i l'eradicació de determinades encefalopaties espongiformes transmissibles (DOCE L 147 de 31-5-01).*

*Reglament CE núm. 1248/2001 de la Comissió, de 22 de juny, pel qual es modifiquen els annexos III, X i XI del Reglament CE núm. 999/2001 del*

Parlament Europeu i del Consell pel que fa a la vigilància epidemiològica i els controls de les encefalopaties espongiformes transmissibles (DOCE L 173 de 27-6-01).

*Reglament CE núm. 1326/2001 de la Comissió, de 29 de juny, pel qual s'estableixen mesures transitòries per permetre el pas al Reglament CE núm. 999/2001 del Parlament Europeu i del Consell, pel qual s'estableixen disposicions per a la prevenció, el control i l'eradicació de determinades encefalopaties espongiformes transmissibles i es modifiquen els annexos VII i XI de l'esmentat Reglament (DOCE L 177 de 30-6-01).*

## Legislació estatal

*Resolución de 4 de julio de 1996, de la Dirección General de Salud Pública, por la cual se adoptan medidas urgentes de supresión cautelar de la entrada de determinados productos de animales bovinos procedentes de Francia, Irlanda, Portugal y Suiza (BOE 178 de 24-7-96). **Actualment derogada***

*Resolución de 9 de octubre de 1996, de la Dirección General de Salud Pública, por la cual se adoptan medidas de protección frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles de algunos rumiantes (BOE 253 de 19-10-96). **Actualment derogada***

*Orden de 30 de abril de 1997, por la que se adoptan medidas cautelares en las importaciones de animales vivos y productos bovinos procedentes de Suiza (BOE 104 de 1-5-97). **Actualment derogada***

*Orden de 24 de septiembre de 1998, por la que se prohíbe cautelarmente la introducción de bovinos procedentes de Portugal (BOE 230 de 25-9-98). **Actualment derogada***

*Orden de 10 de mayo de 1999, por la que se adoptan medidas cautelares de protección frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles de los rumiantes (BOE 116 de 15-5-99).*

*Orden de 22 de julio de 1999, por la que se adoptan medidas complementarias a las dispuestas en la Orden de 10 de mayo de 1999, por la que se adoptan medidas cautelares de protección frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles de los rumiantes (BOE 176 de 24-7-99).*

*Orden de 30 de septiembre de 1999, por la que se corrigen errores a la Orden de 22 de julio de 1999, por la que se adoptan medidas complementarias a las dispuestas en la Orden de 10 de mayo de 1999, por la que se adoptan medidas cautelares de protección frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles de los rumiantes (BOE 241 de 8-10-99).*

*Orden de 28 de diciembre de 1999, por la que se adoptan medidas cautelares en las importaciones de animales bovinos y embriones bovinos originarios o procedentes de Suiza (BOE 313 de 31-12-99).*



*Orden de 8 de noviembre de 2000*, por la que se prohíbe cautelarmente la introducción de animales y ciertos productos de la especie bovina originarios o procedentes de Francia e Irlanda (BOE 269 de 9-11-00).

*Real Decreto 1911/2000, de 24 de noviembre*, por el que se regula la destrucción de los materiales especificados de riesgo en relación con las encefalopatías espongiformes transmisibles (BOE 283 de 25-11-00).

*Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre*, por el que se establece y regula el Programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales (BOE 307 de 23-12-00).

*Orden de 28 de diciembre de 2000*, por la que se establece el plan de adquisición de bovinos de más de 30 meses a los que no se les haya practicado la prueba de detección de la EEB (BOE 313 de 30-12-00).

*Orden de 12 de enero de 2001*, por la que se desarrolla el Anexo XI del Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre, por el que se establece y regula el Programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales (BOE 12 de 13-1-01).

*Orden de 31 de enero de 2001*, por la que se complementa la Orden de 28 de diciembre de 2000, por la que se establece el Plan de adquisición de bovinos de más de treinta meses a los que no se les haya practicado la prueba de detección de la EEB (BOE 28 de 1-2-01).

*Real Decreto 221/2001, de 2 de marzo*, por el que se regula la destrucción de los materiales específicos de riesgo en relación con las encefalopatías espongiformes transmisibles (BOE 54 de 3-3-01).

*Orden de 30 de marzo de 2001*, por la que se establecen las medidas de aplicación complementarias del Real Decreto 221/2001, de 2 de marzo, por el que se modifica el Real Decreto 1911/2000, de 24 de noviembre, por el que se regula la destrucción de materiales específicos de riesgo (BOE 78 de 31-3-01). **Actualment derogada**

*Orden de 26 de abril de 2001*, por la que se deroga la Orden de 8 de noviembre de 2000, por la que se prohíbe cautelarmente la introducción de animales y ciertos productos de la especie bovina originarios o procedentes de Francia e Irlanda (BOE 102 de 28-4-01).

*Corrección de erratas del Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre*, por el que se establece y regula el Programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales (BOE 99 de 25-4-01).

*Orden de 21 de junio de 2001*, por la que se adoptan medidas complementarias de protección frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles de los rumiantes (BOE 160 de 5-7-01).

*Orden de 29 de junio de 2001*, por la que se prohíbe cautelarmente la comercialización de las carnes de toros de lidia procedentes de espectáculos taurinos (BOE 156 de 30-6-01).

*Orden de 26 de julio de 2001*, para la aplicación del anexo XI del Reglamento (CE) número 999/2001, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2001, por la que se establecen disposiciones para la prevención, control y erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes.

*Orden de 26 de julio de 2001*, por la que se modifican determinados anexos del Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre, por el que se establece el Programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales.

### Legislació autonòmica

*Decret 40/2001, de 6 de febrer*, pel qual s'estableixen mesures addicionals, a Catalunya, de control de l'encefalopatia espongiforme bovina (DOGC 3327 de 14-2-01).

### Informes i articles

The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. European Commission. Directorate-General XXIV, Directorate B. Scientific Health Opinions. Unit B 3 Management of scientific committees II. 8 July 1999.

Prionics-Check. Manual del kit de ensayo para determinación de la proteína priónica específica de la enfermedad, en el ganado bovino y ovino. Prionics AG, Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, CH-8057 Zürich, Switzerland. [www.prionics.com](http://www.prionics.com).

The safety of tallow obtained from ruminant slaughter by-products. Adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 28-29 June 2001.

Opinion on the questions submitted by EC services following a request of 4 December 2000 by the EU Council of Agricultural Ministers regarding the safety with regard to BSE of certain bovine tissues and certain animal-derived products. Adopted on 12 January 2001.

Final opinion on the Geographical Risk of Bovine Spongiform Encephalopathy (GBR) adopted on 6 July 2000.

Opinion on the Human Exposure Risk (HER) via food with respect to BSE adopted on 10 December 1999.

Listing of Specified Risk Materials: a scheme for assessing relative risks to man - Opinion of the Scientific Steering Committee adopted on 9 De-

ember 1997 (Re-edited version adopted by the Scientific Steering Committee during its Third Plenary Session of 22-23 January 1998).

Opinions adopted by the Scientific Steering Committee at its meeting of 19-20 February 1998.

Office International des Epizooties. Manual of standards. Copyright 2000 OIE [www.oie.int/eng/normes/mmanual/A0010.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A0010.htm).

I Jornada Científicotècnica en Encefalopaties Espongiformes Animals. PRIOCAT, Laboratori de Referència en Malalties Prioniques Animals de Catalunya. 4 de maig de 2001.

The European Commission. Frequently asked questions about BSE-tests. [www.europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse21\\_en.html](http://www.europa.eu.int/comm/food/fs/bse/bse21_en.html).

The European Commission. Reinforcement of BSE monitoring and surveillance through tests. [www.europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/press/press48\\_en.html](http://www.europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/press/press48_en.html).

The European Commission. BSE: Commission evaluating five new tests. [www.europa.eu.int/comm/dgs/health\\_consumer/library/press/press/press94\\_en.html](http://www.europa.eu.int/comm/dgs/health_consumer/library/press/press/press94_en.html).