

**CMIEET**

**Comité Científico Multidisciplinar para la Investigación en  
Encefalopatías Espongiformes Transmisibles**

**Ministerio de Ciencia y Tecnología**

**OPINIÓN CIENTÍFICA:**

***ANÁLISIS Y NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN DE LA ENCEFALOPATÍA  
ESPONGIFORME BOVINA (EEB) EN RELACIÓN CON LA TRANSMISIÓN AL  
HOMBRE A TRAVÉS DE LOS ALIMENTOS***

**Adoptada por el CMIEET (Subcomité de Seguridad)  
en su reunión celebrada en Madrid, el 9 de Octubre de 2001**

**Nota:**

El Subcomité de Seguridad Alimentaria del CMIEET ha elaborado este documento basándose en el análisis y discusión de datos publicados en revistas científicas.

En todo caso, se hace notar que las opiniones vertidas por el CMIEET no vinculan necesariamente al Ministerio de Ciencia y Tecnología.

# ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA Y SU POSIBLE TRANSMISIÓN AL HOMBRE A TRAVÉS DE LOS ALIMENTOS

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
Resumen	3
<b>I.</b> Introducción	3
<b>II.</b> Infectividad de órganos, tejidos y secreciones	5
<b>III.</b> Incidencia de enfermedades de origen prionico en otras especies animales susceptibles de ser empleadas en alimentación humana.	8
<b>IV.</b> Seguridad de los productos considerados como escasamente infectivos y de los que no se ha detectado infectividad	9
<b>IV.1.</b> Grasa de vacuno fundida y gelatina	9
<b>IV.2.</b> Leche y productos lácteos	11
<b>IV.3.</b> Carne y productos cárnicos	12
<b>IV.4.</b> Sangre y suero sanguíneo	13
<b>IV.5.</b> Pescado y productos derivados	14
<b>V.</b> Necesidades de investigación en relación con los alimentos	14
<b>V.1.</b> Desarrollo de métodos de concentración del prion en los alimentos	14
<b>V.2.</b> Búsqueda de métodos de desactivación de priones infectivos	15
<b>V.3.</b> Detección de material nervioso (médula espinal y nervios adyacentes) y ganglios espinales en carne	17
<b>V.4.</b> Trazabilidad	17
<b>V.5.</b> Evitar que el prion ingrese a la cadena alimentaria	18
<b>VI.</b> Acrónimos	19
<b>VII.</b> Bibliografía	20

## **COMITÉ CIENTÍFICO MULTIDISCIPLINAR DE ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES (CMIEET)**

### **Análisis y necesidades de investigación de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en relación con la transmisión al hombre a través de los alimentos**

#### **RESUMEN**

La transmisión de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) al hombre a través de productos cárnicos procedentes de animales enfermos indujo a realizar una serie de investigaciones que, junto a los datos que se iban acumulando sobre la enfermedad, permitieron a las autoridades sanitarias, primero del Reino Unido y después de la UE, tomar medidas para salvaguardar la salud del consumidor. Así, se estableció una escala de peligrosidad de órganos, tejidos y secreciones de acuerdo con la infectividad potencial de los mismos y se fijaron los productos MER (material específico de riesgo).

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas acerca de la estructura molecular, patogenicidad, transmisión, resistencia, etc. de los priones, el conocimiento que se posee sobre algunos de estos aspectos es aún bastante incompleto y se precisan muchos más estudios para aclarar numerosas cuestiones de gran trascendencia. Entre ellas, las más directamente relacionadas con la seguridad alimentaria.

Con el presente documento se pretende identificar algunos de los puntos oscuros acerca de la transmisión de la EEB a través de los alimentos y aportar ideas sobre algunas de las posibilidades que hay para abordar el problema. A medida que avancen las investigaciones y se aporten nuevos datos sobre los priones surgirán nuevas posibilidades.

Entre las investigaciones necesarias en relación con los alimentos cabe citar: a) desarrollo de una prueba de gran sensibilidad que permita detectar un bajo título (del orden de pg) de priones, b) desarrollo de un método de enriquecimiento (concentración/amplificación) de priones en una muestra, c) búsqueda y caracterización de factores y procesos para desactivar priones infectivos (desnaturalización, precipitación, digestión, tratamientos físicos, químicos y biológicos selectivos, etc.), y d) detección de tejido nervioso y ganglios espinales MER en carne y productos cárnicos y en alimentos o ingredientes alimentarios en general.

#### **I. INTRODUCCIÓN**

La EEB se observó por vez primera en el Reino Unido en Abril de 1986 y se diagnosticó como tal unos meses después, en Noviembre de 1986, en el Central Veterinary Laboratory de Weybridge. Aparecieron unos pocos casos en 1987 y ya en 1988, con 2.514, se produjo el gran salto (se había sextuplicado el número de casos en relación con la totalidad de los observados hasta entonces) que fue en aumento progresivamente hasta 1992. El incremento del número de casos se produjo unos diez años después de que, por razones económicas, se modificara la tecnología de fabricación de harinas de carne y huesos (HCH) sustituyendo el

método tradicional (extracción de la grasa con disolventes a una temperatura de más de 80 °C durante 8 horas seguido por un tratamiento con vapor a 120–130 °C durante alrededor de 90-120 minutos) por otro menos agresivo (extracción de la grasa con un tratamiento con vapor a aquellas temperaturas pero con tiempos más cortos, seguido por centrifugaciones para separar la grasa). Se sospechó, pues, que la difusión de la enfermedad se debía al consumo de piensos fabricados con HCH y, en 1989, se prohibió en el Reino Unido alimentar al ganado vacuno con piensos fabricados con despojos de rumiantes. Más tarde (Wood y col., 1997), se planteó que la modificación que se introdujo en la fabricación de harina de HCH, al hacer el proceso menos agresivo, podría haber permitido que el agente infeccioso de la EEB, muy resistente a la desactivación por numerosos agentes (Marsh y Bessen, 1993; Taylor, 1996, 1998, Brown, 1998), se reciclara y concentrara en rumiantes alimentados con piensos que contenían los subproductos mencionados.

En 1990 se habían confirmado unos 15.000 casos y en los años siguientes (entre 1990 y 1995) se presentaron las mayores incidencias, entre 14.000 y 37.000 casos anuales; en total, en 1995 se habían diagnosticado 160.742, siendo 1992 el año en que se alcanzó el máximo con 36.682 casos, a partir del cual empezó a descender el número anual de animales afectados. Habían pasado 4 años desde que se prohibió alimentar al ganado con piensos fabricados con subproductos de rumiantes, lo que confirmó lo que todavía hoy se considera la principal forma de transmisión.

A pesar de todos estos antecedentes, hasta 1996 no hubo datos epidemiológicos que apuntasen a la transmisión de la EEB al hombre. La aparición de dos casos de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD) en jóvenes, en los que además las lesiones histológicas no eran las habituales, el aumento del número de casos de CJD y la caracterización de algunos de ellos como una nueva variante de CJD (vCJD), llevó a la sospecha que los casos de vCJD se debían al consumo de alimentos que contenían un elevado título del agente de la EEB, antes de la prohibición de los piensos de HCH de rumiantes para la alimentación del ganado vacuno. La situación indicaba que el periodo de incubación era de 5 – 10 años, lo que no pareció excesivo dado que el periodo de incubación más corto de una enfermedad priónica (exceptuando la transmisión yatrógena) es el del kuru (en cuya transmisión no hay barrera de especies) con un tiempo de 4-5 años (Prusiner, 1995). En 1996, de una forma oficial, el British Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (SEAC) concluyó que “la explicación más probable en este momento es que los casos de vCJD estén asociados a la exposición a la EEB antes de la prohibición de los despojos específicos de bovinos en 1989”. Realmente, entonces no existía una evidencia categórica de la transmisión de la EEB al hombre e incluso todavía en publicaciones recientes se alude a ella con suma cautela (Balzer, 2000; Ghani y col., 2000; Andrews y col., 2000). No obstante, los resultados de las investigaciones dejan cada vez menos dudas de la relación existente entre vCJD y EEB. Así, Bruce y col. (1997) analizaron las lesiones producidas en ratones a los que se les había inyectado tejidos que contenían los agentes de EEB, CJD, y vCJD; concluyeron que la cepa del prion que causa la vCJD y la que origina la EEB era la misma. A igual conclusión habían llegado Collinge y col. (1996) estudiando algunas propiedades químicas de las proteínas priónicas y Hill y col. (1997) mediante el estudio de los perfiles de glicosilación de unos y otros priones. En cualquier caso, la publicación en *The Lancet* (Will y col., 1996) de la caracterización de la vCJD en el Reino Unido y la posible transmisión de la EEB al hombre adquirió unas

dimensiones sociales alarmantes aunque en ese artículo también se decía que tal transmisión no se podía confirmar. No obstante, durante los cinco años transcurridos desde entonces se ha consolidado la hipótesis, sobre todo basándose en resultados de Zeidler e Ironside (2000): la asociación temporo-espacial de los casos que se han presentado en el Reino Unido, los ensayos biológicos realizados (consistente periodo de incubación e igual modelo neuropatológico en ratones y macacos inoculados) y la similitud en la estructura molecular de los agentes de la vCJD y EEB.

En definitiva, en el Reino Unido se han presentado 101 casos \*de vCJD desde su aparición en 1994 (3 en 1995, 10 en 1996, 10 en 1997, 18 en 1998, 15 en 1999, 28 en 2000, uno de ellos sin confirmar y hasta la fecha\*, 5 confirmados y 5 probables sin confirmar más 7 probables vivos). Actualmente, una de las mayores preocupaciones es la imposibilidad de saber cual va a ser la magnitud futura y la distribución geográfica tanto en países que importaron ganado vacuno o productos cárnicos británicos como en aquellos con casos endógenos de EEB, ya que personas aparentemente sanas pueden estar incubando la enfermedad (Brown y col., 2001). Téngase en cuenta, por una parte, el largo periodo de incubación y, por otra, que se ha estimado (Anderson y col., 1996) que entre 1989 y 1995 el 3-5% de los animales (283.000) que en el Reino Unido alcanzaron la cadena alimentaria podrían haber estado infectados, a los que hay que sumar los millares que entraron antes de 1989.

## II. INFECTIVIDAD DE ÓRGANOS, TEJIDOS Y SECRECIONES

Se han realizado numerosas investigaciones sobre los tejidos y órganos peligrosos y es ingente la literatura que se ha acumulado acerca del problema. A pesar de ello, conviene decir que, en general, las EETs y, de forma particular, la EEB y la vCJD no se conocen todavía bien, pero la enorme difusión de la enfermedad en el ganado vacuno, la gravedad de la misma y la alarma social que se ha creado por su posible transmisión al hombre ha forzado a las autoridades sanitarias europeas y nacionales a tomar medidas para prevenir la difusión de la enfermedad y evitar que los productos peligrosos de origen bovino alcancen la cadena alimentaria. Los materiales procedentes de animales afectados por EEB que han dado resultados positivos en ensayos de inoculación o alimentación de ratones o terneras son: cerebro y tejidos relacionados (duramadre, pituitaria, etc.), médula espinal, retina, íleon distal, linfocitos, ganglios espinales y ganglios del trigémino (Anderson y col., 1996; MAFF, 1997). En el resto de tejidos y secreciones procedentes de animales bovinos afectados no se ha podido demostrar su infectividad, incluidas la carne y la leche (Taylor y col., 1995; Brewer, 2001). A pesar de todos estos trabajos, la opinión científica no es unánime acerca de la seguridad que se atribuye, por ejemplo, a la carne de vacuno, sobre todo a la luz de los hallazgos de Bruce y col. (1997) y Hill y col. (1997).

Para que se haga efectiva la transmisión de la EEB a la especie humana, hay que tener en cuenta que el riesgo de infección en el hombre depende de (Brewer, 2001):

- **La barrera de especie.** La transmisión de la enfermedad producida por el prion de una especie a otra no es nada fácil; sólo una pequeña proporción de individuos desarrollan la enfermedad, requiriendo además dosis elevadas de tejido afectado.

---

\* A 28 de Julio

La barrera de especie no es constante, variando entre distintas especies y entre diferentes enfermedades (Collinge y col., 1996). Sin embargo, una exposición suficiente al agente infeccioso puede superar la barrera en muchos casos (véase Howard, 1996). La extensión en que el prion consigue atravesar las barreras de las especies depende de diversos factores, como cepa del prion, dosis del mismo, genética del receptor y ruta de introducción (Palmer y Collinge, 1993). En el caso de la EEB, los cálculos realizados (Ghani y col., 2000) mediante modelizaciones con datos existentes hasta el año 2000 e incluyendo una serie de variables (periodo de incubación, eficacia de las medidas de control para la exposición frente a material infectado, porcentaje de la población susceptible como consecuencia de su genotipo, etc.) han permitido inferir que no más de dos casos de vCJD pueden aparecer por el consumo de un bovino masivamente infectado, lo que sugiere una barrera de especie sustancial, dado que productos procedentes de ese animal pueden llegar a muchas personas.

A partir de experiencias en ratones de la misma línea genética se ha podido estimar, utilizando elevados títulos de EEB ( $10^7$ ), una barrera genética intra-especie de 1:1000 (Collinge y col., 1995; 1996). Basándose en estos datos, se ha deducido (Brewer, 2001) que la barrera inter-especie ha de tener un valor superior a aquel que puede llegar a ser del orden de  $1:10^7$  entre especies filogenéticamente muy alejadas.

- **La dosis del agente infeccioso.** La infectividad de las encefalopatías espongiformes transmisibles se ha establecido mediante bioensayos en ratón y se expresa en  $\log_{10}UI/g$ , siendo una UI la cantidad mínima de tejido requerido para infectar otro animal de la misma especie mediante inoculación intracerebral (Dealer, 1993). De acuerdo con un ejemplo de Dealer (1993) en la oveja, la infectividad del músculo y riñón (alrededor de 2,5 UI/g) < glándulas suprarrenales < pituitaria < nervios < linfa < médula espinal < cerebro (alrededor de 7), lo que en la práctica quiere decir que el cerebro tiene un poder infeccioso 10.000 – 100.000 veces mayor que el músculo o riñón. La infectividad en humanos se ha considerado similar (Brown y col., 1994) aunque el Comité Director Científico (CDC) de la UE ha expresado muchas dudas al respecto (CDC, 2001). Se ha estimado (Wuthrich, 1996) que una UI equivale a unas  $10^5$  moléculas de prion infeccioso ( $PrP^{sc}$ ) y como todos los tejidos no tienen la misma carga, unos serán más infecciosos que otros. Es relativamente fácil transmitir la EEB al ratón pero lo es más aún a la ternera debido a la ausencia de barrera inter-especie, unas 1000 veces mayor que el bioensayo del ratón (Brewer, 2001). De acuerdo con esto, tejidos que no resultan infecciosos en la prueba del ratón pueden ser positivos por inoculación intracerebral en terneras. Así, la linfa y el bazo, ambos negativos en la prueba del ratón, fueron positivos al infectar a terneras. Estas circunstancias determinan la falta de unanimidad acerca de la peligrosidad de ciertos tejidos y secreciones. En muchos casos los resultados no pueden considerarse definitivos porque es posible que los títulos que existen normalmente en los productos ensayados no sean suficientes para inducir la enfermedad, al menos, en los tiempos de experimentación utilizados (Brewer, 2001).

- **Ruta de introducción en el receptor.** En los bioensayos, no se obtienen los mismos resultados si se administra el tejido infectado con priones por vía oral o si se inocula en la conjuntiva o intracerebralmente. Se ha estimado (Kimberlin, 1994) que la vía intracerebral es  $2 \times 10^5$  veces más potente que la oral. Se ha observado que en el vacuno, sin barrera de especie, con una dosis oral elevada se manifiestan los signos clínicos de la enfermedad unos 35 meses después (MAFF, 1997). Aún se desconoce cómo el agente infeccioso se propaga desde el intestino al sistema nervioso central (SNC) pero, al haberse encontrado en tejidos linfáticos y en el intestino delgado (Anderson y col., 1996; MAFF, 1997), se ha hipotetizado que pasa a través de las placas de Peyers y es la linfa el fluido portador. Algunas especies afectadas por ciertas encefalopatías espongiiformes transmisibles tienen el agente en su sangre pero, por ahora, esta circunstancia no se ha podido detectar en bovinos infectados. No obstante, como más adelante se discutirá, se ha demostrado recientemente (Fischer y col., 2000) en ratón y en el hombre que el PrP<sup>sc</sup> se fija a una proteína, el plasminógeno, presente en la sangre.

De acuerdo con los conocimientos científicos disponibles, el CDC (1997) de la UE ha establecido una escala de peligrosidad según la infectividad potencial de los diferentes órganos y tejidos de los animales afectados de EEB:

#### 1. Muy infectivos

- a) Bovino: cerebro, ojos, médula espinal, ganglios espinales, duramadre, pituitaria, cráneo y columna vertebral y pulmones.
- b) Ovino y caprino: cerebro, ojos, médula espinal, ganglios espinales, columna vertebral, bazo y pulmones.

#### 2. Medianamente infectivos

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

#### 3. Escasamente infectivos

Hígado, páncreas, timo, médula ósea, otros huesos, mucosa nasal y nervios periféricos.

#### 4. No se ha detectado infectividad

Músculos esqueléticos, corazón, riñones, calostro, leche, tejido adiposo, glándulas salivales, saliva, tiroides, ubres, ovarios, testículos, tejido conjuntivo, tejido cartilaginoso, piel, pelo, sangre, suero, orina, bilis y heces.

De todos esos productos, los de mayor grado de infectividad son los que han venido a denominarse materiales MER (materiales específicos de riesgo). La UE en la Decisión

001/2/CE ha definido los órganos y tejidos MER para diversos países de la UE, entre ellos España.

a) El cráneo, incluidos el encéfalo y los ojos, las amígdalas y la médula espinal de los bovinos de más de doce meses, así como los intestinos, desde el duodeno hasta el recto de los bovinos de cualquier edad. La grasa y ganglios mesentéricos están pendientes de ratificación por el CDC

b) El cráneo, incluidos el encéfalo y los ojos, las amígdalas y la médula espinal de los ovinos y caprinos de más de doce meses de edad o en cuya encía haya apuntado un incisivo definitivo, así como el bazo de los ovinos y caprinos de todas las edades.

La legislación española (R.D. 1911/2000 de 24/11, R.D. 3454/2000 de 22/12 y R.D. 221/2001 de 02/03) incluye además en el apartado a) “la columna vertebral, excluidas las vértebras caudales e incluidos los ganglios radicales posteriores”. Asimismo, introduce un apartado c) que recoge “los cadáveres de los bovinos de más de doce meses y de los ovinos y caprinos de cualquier edad”

Respecto a los pequeños rumiantes, el CDC (1998) opina que en muchos países las ovejas y cabras han estado expuestas probablemente al agente de la EEB a través de los piensos de HCH y que es posible que el agente de la EEB se haya mantenido, propagado y reciclado en estos rumiantes, concluyendo que aunque la EEB no se ha identificado en ovejas y cabras en condiciones de campo, la posibilidad de que estos animales contraigan la enfermedad no puede excluirse. El CDC, que estableció los productos MER procedentes de ovejas y cabras que anteriormente se han mencionado, recientemente revisó (CDC, 2000) la situación, se ratificó en las opiniones emitidas previamente (CDC, 1998) y consideró que desde 1998 el riesgo de que los animales adquirieran la enfermedad había disminuido a raíz de la prohibición de las HCH y la eliminación de los productos MER. Sin embargo, si la EEB ha sido introducida en los rebaños de pequeños rumiantes y si su comportamiento es como el scrapie, el riesgo de propagación permanece inalterado.

### **III. INCIDENCIA DE ENFERMEDADES DE ORIGEN PRIÓNICO EN OTRAS ESPECIES ANIMALES SUSCEPTIBLES DE SER EMPLEADAS EN ALIMENTACIÓN HUMANA**

Las referencias bibliográficas sobre la presencia de encefalopatías espongiiformes en especies animales susceptibles de ser empleadas en la alimentación humana no son muy abundantes.

Schoon y col. (1991) describieron los casos de tres avestruces en dos zoos del norte de Alemania con sintomatologías y lesiones similares a las de la EEB. Las aves presentaban síntomas de nerviosismo con ataxia, alteraciones en el equilibrio, descoordinación de movimientos durante la alimentación y lesiones microscópicas en el tronco del encéfalo y médula oblonga. La alimentación de estas aves incluía piensos con ingredientes de animales con síntomas de EEB. No se diagnosticó concluyentemente la presencia del agente de la EEB y no fue posible descartar la etiología tóxica o nutricional. Los autores señalaron la existencia de más animales en ambos zoos que murieron presentando los mismos síntomas, pero no pudieron ser examinados *post-mortem*.

En una explotación de ganado vacuno de Kent (Reino Unido) en la que se habían detectado casos de EEB se observó una gallina de 30 meses (que vivía libre en la explotación) con alteraciones del comportamiento tales como dificultades para entrar en el gallinero, mostrándose asustadiza y perdiendo el equilibrio ante situaciones de estrés. La enfermedad duró al menos 10 semanas. En la fase final el animal mostró una marcada pérdida de peso, ataxia progresiva, violentos temblores. Las lesiones histológicas se correspondían con las de muerte neuronal siendo ésta más evidente en las células de Purkinje. La vacuolización era mínima. Los estudios inmunohistoquímicos no consiguieron esclarecer la etiología de este proceso (Cawthorne, 1997; Narang y col., 1997).

Dawson y col. (1991) llevaron a cabo un estudio experimental de transmisión de EEB en aves domésticas, hámsters, cerdos y vacas, inoculando por vía parenteral un homogeneizado de cerebro infectado de EEB. Además, a los cerdos y aves se les administró por vía oral el homogeneizado. Los resultados confirmaron la transmisión en ganado vacuno y porcino. La transmisión de EEB no se confirmó en hámster y aves, aunque los estudios en estas especies se encontraban incompletos en la fecha de la publicación de estos resultados. No se ha encontrado ninguna cita posterior de estos autores en la que se completen estos datos.

No se han publicado estudios destinados a conocer si el pescado es susceptible de albergar el prion de la EEB o si puede adquirir la enfermedad. Si el pescado procede del medio marino (capturas) la posibilidad de que albergue el agente de la EEB es prácticamente nula. Por tanto, sólo los procedentes de la acuicultura pueden suponer un cierto riesgo siempre y cuando los peces se hubiesen alimentado con piensos elaborados con productos MER.

Aunque parece difícil que se transmita la enfermedad EEB a las especies animales, no bovinas y ovinas, empleadas en la alimentación humana, es necesario tener mucha cautela. En particular, los resultados de Hill y col. (2000) y los de las investigaciones actualmente desarrollándose (Figueras, comunicación personal) apuntan a que los tejidos de especies animales distintas a las bovinas y ovinas alimentadas o inoculadas con PrP<sup>sc</sup> pueden inducir encefalopatías espongiformes en especies susceptibles, distintas a las ovinas y caprinas.

#### **IV. SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS CONSIDERADOS COMO ESCASAMENTE INFECTIVOS Y DE LOS QUE NO SE HA DETECTADO INFECTIVIDAD**

##### **IV.1. Grasa de vacuno fundida y gelatina**

Estos dos productos procesados derivados de subproductos animales merecen especial atención en relación con la EEB por ser ingredientes de muchos alimentos, productos farmacológicos, cosméticos y piensos para animales.

La **grasa de vacuno fundida** (en inglés tallow) es el producto sólido procedente de depósitos grasos de vacuno que se separa por medios físicos de diversas partes del animal. El Codex Alimentarius (1969) indica que la grasa de vacuno comestible ha de proceder sólo de órganos específicos de animales bovinos sanos. Este producto se prepara mediante un tratamiento a una temperatura del orden de 80 °C en cambiadores de calor cilíndricos, cuyo interior está dotado de cuchillas para que la acción mecánica y el calor, respectivamente,

rompan las células y fundan el material lipídico. En el extracto resultante se separan los sólidos que, tras su secado, se destinan a producir pienso para animales (Dugan, 1987). No es de extrañar que, en un principio, la UE prohibiera importar a sus países miembros, junto a otros productos procedentes de bovinos, esta grasa recuperada de subproductos.

En 1996, el Institute of Food Science and Technology del Reino Unido (IFST, 1996) estableció que la grasa fundida de vacuno, entre otros productos, no entrañaba ningún riesgo significativo de causar la enfermedad. Ese mismo año la UE levantó la prohibición (Decisión 96/362/EC) pero matizando que el material de origen debía proceder de animales aptos para el consumo humano y que se permitirían los productos hidrolizados a 250 °C o más aunque más tarde la UE (Decisión 97/534/EC) concluyó que un producto extraído a 133 °C durante 20 minutos o más, era seguro y así lo ha entendido también la OMS. En definitiva, se considera un producto totalmente apto para los fines especificados.

Un 65% de la **gelatina** producida en el mundo procede de recortes de piel, tejido conectivo y huesos de vacuno; el resto proviene del cerdo (Schrieber y Seybold, 1993). La fabricación de gelatina, a partir de hueso o piel implica, en esencia, una trituración, eliminación de la grasa con agua muy caliente (70-80 °C), secado (30 minutos a > 100 °C), desmineralización con HCl durante 5 días hasta a una concentración final de 0,1 M HCl (pH 1,5), rotura de los enlaces cruzados entre las moléculas de colágeno mediante alcalinización (pH 12,5) con Ca(OH)<sub>2</sub> a saturación durante 20 – 50 días y el producto resultante sufre un tratamiento UHT de 140 °C o más durante 4 segundos. Sin necesidad de ensayo alguno se puede inferir que es un tratamiento tremendamente agresivo para que una proteína muy resistente, como el prion, pueda mantener su configuración original. No obstante, se ha informado que el tratamiento UHT sólo puede ocasionar hasta 4 reducciones decimales (Taylor y col., 1994), lo que no anularía la infectividad. El IFST (1999), basándose en investigaciones al respecto (Taylor y col., 1994; Inveresk Research International, 1998; Shepherd, 1999), ha estimado que la actividad del agente de la EEB se puede reducir un centenar de veces durante la extracción de la grasa, un centenar de veces en la operación de desmineralización, un millar de veces en el tratamiento alcalino y otras cien veces en la esterilización final (asumiendo un curso logarítmico de desactivación). En total, el efecto combinado del proceso completo conlleva una reducción del orden de 9 unidades de magnitud superior, pudiéndose aumentar la eficacia unas 100 veces más si en vez de Ca(OH)<sub>2</sub> a saturación se utiliza 0,25 – 0,30 M NaOH (CDC, 2000a, Grobber y col., 2001). Disminuciones de 9 – 11 unidades logarítmicas reducen claramente el riesgo a niveles estadísticamente despreciables; en la práctica lo anula ya que los materiales que constituyen la materia prima están clasificados entre los productos que “no se ha detectado infectividad” (piel, cartílagos, etc.) o se consideran escasamente “infectivos” (médula ósea y huesos). Sin embargo, el proceso de obtención de gelatina que de forma resumida se ha descrito puede sufrir diversas modificaciones, como filtraciones, lavados diversos, centrifugaciones, cromatografías de intercambio iónico, otras modalidades de tratamientos térmicos, etc.

La UE, al igual que con la grasa de vacuno fundida, prohibió en principio la importación de gelatina a los países miembros pero la levantó en 1996 (Decisión 96/362/EC), matizando que la materia prima debería proceder de animales aptos para el consumo y que se fabricara la gelatina ajustándose a las etapas del proceso que se ha descrito anteriormente de forma resumida. Igualmente, la FDA indicó en 1997 que no había bases científicas para prohibir

el uso de gelatina destinada a preparar productos que se consumieran por vía oral o para cosmética siempre que la materia prima no estuviera contaminada con material MER y procediera de bovinos que no mostraran signos de la enfermedad. Sin embargo, en un afán de proteger al máximo al consumidor, establecía que no se debía usar gelatina procedente de países en que se habían dado casos de EEB en la preparación de productos inyectables, para aplicaciones oftálmicas o implantes.

Cabe apuntar al respecto que no han tenido éxito los intentos que se han hecho para sustituir la gelatina por otros productos alternativos (pectinas, xantanos, goma guar, carragenatos, almidones, etc) con fines culinarios, cosméticos, etc. (Anónimo, 2000; Helcke, 2000, Rogers, 2000). No se ha podido encontrar un producto mejor que la gelatina para los fines en los que tradicionalmente se utiliza, ya que tiene una serie de ventajas que en algunos de los trabajos anteriores (Helcke, 2000) se discuten pero, entre todas ellas, la gelatina tiene una propiedad singular y única que la hace insustituible; es la de ser un hidrocoloide de gelificación termorreversible con un punto de fusión en torno a los 37 °C (Helcke, 2000, Rogers, 2000).

A pesar de todo, hay un riesgo que no se puede obviar. Es la contaminación potencial de la materia prima con material MER durante su manipulación. En este punto alcanzan una especial relevancia los huesos que componen la columna vertebral, ya que no es fácil separar los ganglios espinales de la misma. Esta cuestión está siendo actualmente analizada por el CDC y, hasta el momento, sólo ha indicado (CDC, 2000b) que está por decidir si la columna vertebral debe separarse o no, lo que dependerá de los resultados relativos a los niveles de riesgo residual que se consideren aceptables. Sin embargo, el CDC considera que la seguridad adicional que puede obtenerse al separar la columna vertebral para la producción de grasa de vacuno fundida o gelatina es limitada en los países con bajo riesgo de EEB pero debe considerarse suficientemente importante como para excluirla en los países de alto riesgo.

## **IV.2. Leche y productos lácteos**

En 1995 se realizó una investigación con ratones recién destetados usando leche procedente de 6 vacas confirmadas de padecer EEB; ni la inoculación intracerebral, ni la inyección intraperitoneal, ni la alimentación con leche durante 40 días pudo inducir la enfermedad en el periodo controlado (cerca de dos años). Tampoco se pudo detectar lesión alguna en los análisis neurohistológicos que se hicieron en muestras de cerebro (Taylor y col., 1995). Este experimento, junto a otras investigaciones, ha servido, probablemente, para que el IFST (1996) se pronunciara en el sentido de considerar a la leche y productos lácteos sin riesgo significativo de transmitir la EEB. Esta conclusión se recoge, igualmente, en numerosas revisiones que se han publicado sobre la enfermedad y su posible transmisión al hombre (p.e. Collee y Bradley, 1997; Blanchfield, 1999; Brewer, 2001). El hallazgo reciente de que una proteína en la sangre, el plasminógeno, fije el prion infeccioso (Fischer y col., 2000) permite inferir que éste puede llegar a la glándula mamaria por vía sanguínea aunque las repercusiones posteriores carecen de importancia como parece demostrar el trabajo de Taylor y col. (1995). No obstante, debería mantenerse una cierta cautela en función de cómo evolucionen los hallazgos al respecto.

Por otro lado, el CDC (2001) ha considerado también la presencia en la leche de otros agentes que le confieren capacidad infectiva potencial, los leucocitos, sin que hayan variado los criterios anteriores sobre la ausencia de riesgo apreciable de la leche y calostro aunque, por razones de precaución, se recomienda que la leche y productos lácteos procedentes de animales sospechosos de EEB no se ofrezcan para el consumo.

El calostro, la primera secreción que sale de la ubre al principio de la lactación, se produce en condiciones de singular permeabilidad del tejido de la glándula mamaria y tiene una composición muy distinta a la de la leche; es rico en vitamina A, ciertas sales y proteínas y, sobre todo, en inmunoglobulinas; contiene una gran cantidad de leucocitos y menos lactosa que la leche. Quizás no tenga importancia desde el punto de vista de la transmisión de la EEB al hombre, entre otras razones a las emitidas por el Comité Director Científico (CDC, 2001), porque está prohibido en alimentación humana pero sí podría ser un tema de investigación la posible contaminación de los terneros lactantes.

### **IV.3. Carne y productos cárnicos**

La carne de vacuno goza de una seguridad similar a la de la leche y así se ha recogido en diversos artículos (Collee y Bradley, 1997; Blanchfield, 1999; Brewer, 2001), indicándose en el más reciente “hasta la fecha no ha sido transmitida (la EEB) por la carne o leche de vacuno”. Igualmente, tampoco se ha descrito ningún caso de transmisión por la carne de otras especies domésticas, ni siquiera de aquellas que pueden padecer otras enfermedades priónicas.

Sin embargo, una circunstancia muy diferente se da en ciertos productos cárnicos, los preparados, entre otros ingredientes, con recortes y porciones procedentes de zonas adyacentes a la columna vertebral, sobre todo la carne recuperada mecánicamente que mediante paletas a gran velocidad se desprende de los huesos y, por tanto, de la espina dorsal. No es fácil, por una parte, separar totalmente la médula espinal y nervios adyacentes de la columna vertebral y, en consecuencia, esta carne puede contaminarse con material nervioso clasificado como MER y, por otra, en esa región anatómica se localizan los ganglios espinales, clasificados por el CDC de la UE como muy infectivos. Al intentar desprender la carne del soporte óseo, esas estructuras pueden pasar parcialmente a la carne y de ahí a los numerosos productos cárnicos que se fabriquen a partir de ella, como hamburguesas, albóndigas, salchichas, tanto crudas como cocidas (tipo frankfurt y similares), embutidos curados y otros productos formulados que se estabilizan mediante tratamientos térmicos. Téngase en cuenta al respecto que la resistencia térmica que presentan los priones es tal, que las condiciones de tiempo y temperatura del autoclavado tradicional son insuficientes para su destrucción (Brown y col., 1990; Taylor y col., 1999) y, por tanto, soportan también los tratamientos térmicos que se aplican a los alimentos para conseguir la esterilidad comercial que, como máximo, son de un F<sub>0</sub> de alrededor de 8 minutos. No quiere esto decir que aquellos productos cárnicos sean peligrosos en sí sino que hay que evitar que restos de los MER alcancen los productos contemplados como seguros. Urge una prueba para detectar pequeñas cantidades de médula espinal y ganglios espinales en la carne.

Otra situación de riesgo podría presentarse en otros productos cárnicos, los embutidos. En España no se fabrican tradicionalmente embutidos con porciones de tejido nervioso por lo

que esto no debe ocasionar problema alguno pero sí podrían ocasionarlo cuando las tripas de ganado vacuno se utilizaban para este fin antes de la clasificación de las mismas como material MER. Ahora, el intestino completo de vacuno es producto MER y hay que eliminarlo. No debería, pues, llegar a la cadena alimentaria. No obstante, debería tenerse en consideración que en los embutidos de calibre grueso (a partir de 55-60 mm) se utilizan tripas cosidas o laminadas. Las primeras son de doble capa y como mínimo siempre una de ellas es de intestino de vacuno (por motivos de permeabilidad y resistencia) y se conservan deshidratadas durante largos periodos de tiempo hasta su utilización.

#### **IV.4. Sangre y suero sanguíneo**

En la sangre y sus derivados no se ha observado infectividad y están clasificados como de escaso riesgo (Decisión 97/449/EC). En la sangre, en sí, no se ha podido detectar el agente infeccioso (Brewer, 2001), lo que no sugiere que este fluido actúe como vehículo portador. Quizás, esto ha contribuido a que se atribuya a la linfa esta función.

Recientemente, se ha publicado un artículo (Fischer y col., 2000) en el que se informa que una proteína de la sangre, plasminógeno (una pro-proteasa implicada en la excitotoxicidad neuronal) se une al PrP<sup>sc</sup> formando un complejo pero no se fija al PrP<sup>c</sup> inocuo, lo que sugiere que la interacción es específica de la conformación del PrP<sup>sc</sup> y así se pudo confirmar al exponer el complejo plasminógeno-PrP<sup>sc</sup> frente a la acción de un agente desnaturante (urea 6 M), que ocasionaba la disgregación del complejo. Otras proteínas de la sangre ensayadas no interaccionaron con el PrP<sup>sc</sup>. Es el plasminógeno, por tanto, la primera proteína natural que se ha descrito con la capacidad de fijar el PrP<sup>sc</sup>. Esta interacción quizás puede tener un significado patogénico porque el PrP<sup>sc</sup> conduce a una inhibición/modificación local de la actividad de la plasmina, lo que es importante en el remodelado sináptico (Baranes y col., 1998; Madani y col., 1999). Adicionalmente, esta propiedad puede también explotarse para el desarrollo de pruebas diagnósticas, por ejemplo, mediante la preparación de anticuerpos monoclonales frente al complejo. Finalmente, estos resultados parecen indicar que los priones de la EEB pueden ser transportados por la sangre, lo que apoya la observación previa de Houston y col. (2000) acerca de la transmisión del agente de la EEB en ovejas mediante transfusión de sangre. Este hallazgo no contradice en absoluto a las investigaciones anteriores que no pudieron demostrar la presencia del prion en sangre porque puede ocurrir que el prion se vehicule por la sangre pero que no se multiplique ni acumule en ella y al encontrarse a niveles bajos, las técnicas de detección actuales no son lo suficientemente sensibles para detectarlos.

Se ha interrumpido la obtención de proteínas plasmáticas a partir de la sangre recogida en los mataderos de todas las especies animales de abasto. Sin embargo, las empresas productoras sostienen que no hay motivo para no utilizar los derivados plasmáticos procedentes de sangre de cerdo, dado que dicha especie animal parece libre de enfermedades priónicas. Consecuentemente, cabe la posibilidad de que las autoridades comunitarias permitan su uso en un futuro próximo. Al objeto de evitar el fraude y asegurar la ausencia de derivados procedentes de mezcla de sangre que puedan contener de vacuno, deberían contrastarse las técnicas analíticas basadas en PCR para la identificación de la especie animal en estos sustratos.

#### IV.5. Pescado y productos derivados

Anteriormente se ha indicado que no parece probable que la EEB pueda transmitirse al pescado y, en todo caso, sólo podría verse afectado el pescado de acuicultura que consumiera piensos fabricados con productos MER. Pero lo normal es que los piensos para peces (p.e. lubinas y doradas) o crustáceos (p.e. langostinos) se fabriquen con subproductos de la pesca aunque también pueden incorporar sangre de mamíferos, clasificada como material para el que no se ha detectado infectividad.

Ante esta situación, y a pesar de la falta de estudios al respecto, hay que considerar, hoy por hoy, que el pescado es un producto totalmente seguro para la alimentación humana.

#### V. NECESIDADES DE INVESTIGACIÓN EN RELACIÓN CON LOS ALIMENTOS

Ante, por una parte, los antecedentes descritos previamente y, por otra, la insuficiente eficacia de las pruebas existentes para el diagnóstico de la enfermedad *in vivo*, se estima de máxima urgencia **el desarrollo de una prueba de gran sensibilidad** que permita el diagnóstico tempranamente y con un bajo título de priones. Una prueba de esta naturaleza podría también modificarse para la detección de priones en los alimentos. Recientemente, han surgido algunas posibilidades; una de ellas (ya comentada) con el plasminógeno que se fija específicamente PrP<sup>Sc</sup> pero no al PrP<sup>C</sup> inocuo (Fischer y col., 2000).

##### V.1. Desarrollo de métodos de concentración del prion de los alimentos.

El fracaso de todos los intentos de detectar el prion en sangre, leche y otros tejidos y fluidos o de inducir la enfermedad a partir de estos productos puede que se deba a que no se acumula en dichos medios y sus bajos títulos impidan la detección del prion por ensayos inmunológicos o bioensayos en animales de experimentación. Si se dispusiera de un método de concentrar priones en una matriz alimentaria (por ejemplo, aprovechando la gran resistencia del prion frente a diferentes agentes o mediante etapas de ultrafiltración, etc.) se podría aumentar la concentración de priones para tener respuestas positivas, en su caso, a las pruebas de detección.

Se estima que este apartado es muy importante porque si se logra concentrar adecuadamente la proteína prionica, pueden aplicarse después algunos de los métodos de detección de priones infectivos aprovechando las propiedades de los mismos, como resistencia a la degradación, capacidad de fijar cobre (II), etc.

Una de las estrategias podría basarse en la detección de Cu<sup>2+</sup> y Mn<sup>3+</sup> en priones, ya que el prion normal fija selectivamente Cu<sup>2+</sup> (Stoeckel y col., 1998) y según la hipótesis de Purdey (2000) el prion PrP<sup>Sc</sup> debe contener Mn<sup>3+</sup> pero no Cu<sup>2+</sup> y el PrP<sup>C</sup> sí debe contener Cu<sup>2+</sup>.

Otra posibilidad, una vez lograda la concentración de priones, sería la determinación del componente glucídico de la molécula o explotar las actividades de la proteinasa K y la fosfolipasa C fosfatidil inositol específica (Hermann y col., 2001) para discriminar entre priones sensibles y resistentes.

La amplificación de las unidades prionicas existentes en una matriz puede ser una buena alternativa para aumentar la concentración de priones por unidad de volumen. Aunque los detalles moleculares del proceso de replicación del PrP<sup>Sc</sup> no se conocen totalmente, sí se sabe que se produce a expensas del prion normal PrP<sup>C</sup> e implica cambios en la conformación de la proteína (Aguzzi y Weissmann, 1997; Cohen y Prusiner, 1998). Se asume que este fenómeno ocurre *in vivo* y que progresa lentamente, tardando meses e incluso años hasta que se desencadena la enfermedad (Saborio y col., 2001). La aceleración de este proceso es lo que se requiere para conseguir la amplificación del prion infeccioso en tiempos más cortos. Se ha ideado un método *in vitro* que permite la amplificación cíclica de los priones PrP<sup>Sc</sup> (Saborio y col., 2001). La amplificación se basa en múltiples ciclos de incubación (37 °C en agitación) del PrP<sup>Sc</sup> en exceso de priones PrP<sup>C</sup>, seguidos de un tratamiento con ultrasonidos (5 pulsos de 1 segundo cada uno). Durante los periodos de incubación se oligomeriza la fracción prionica PrP<sup>Sc</sup> al incorporarse moléculas de PrP<sup>C</sup> al agregado en crecimiento y durante la sonicación se separan los agregados rindiendo unidades moleculares más pequeñas dispuestas para crecer en la incubación siguiente. El fenómeno se ajusta a una curva exponencial, al menos en el intervalo de 5 – 40 ciclos. Con un tratamiento de 10 ciclos se logra pasar desde el nivel de detección de la técnica inmunoblot ( $0,2 - 0,4 \times 10^{-15}$  moles de PrP<sup>Sc</sup>) hasta  $8,3 \times 10^{-15}$  moles de PrP<sup>Sc</sup> (Saborio y col., 2001), es decir, se multiplica por un factor de alrededor de 30 e incluso más si se aumentan los ciclos. Se podría, pues, idear un método de enriquecimiento de priones en una muestra que recordaría al que, salvando las distancias, se usa para la detección de salmonelas en alimentos.

## V.2. Búsqueda de métodos de desactivación de priones infecciosos.

Se ha demostrado que el prion es tremendamente resistente a agentes desestabilizantes y esterilizantes convencionales: exposición al formol, a elevados niveles (50 kGy) de radiación y a un tratamiento térmico de 360 °C (Brown y col., 1990; Marsh y Bessen, 1993), a la luz ultravioleta de  $\lambda = 250\text{nm}$ , pH extremos, disolventes orgánicos (metanol, hexano, éter de petróleo), al calor húmedo (134 °C, 60 min), a la sequedad (Taylor y col., 1994), a enzimas proteolíticas (Brown y col., 1990), especialmente proteinasa K (Race y col., 1998; Hermann y col., 2001), etc. De todos estos agentes hay algunos que su ineficacia resulta sorprendente dado el carácter proteico del prion, como, por ejemplo, a los tratamientos térmicos cuando se considera de forma general que a partir de 180-200 °C se produce la pirólisis de la materia orgánica. Quizás haya algunos puntos que no están claros aún y convenga estudiar más profundamente.

Recientemente, Supattapone y col. (1999) han observado que las poliaminas ramificadas pueden desactivar de forma muy eficaz los PrP<sup>Sc</sup> en células de neuroblastoma previamente infectadas hasta tal punto que supone no sólo la disminución drástica de PrP<sup>Sc</sup> hasta niveles tales que no se detectan por western blot sino que también se elimina (no se detecta mediante bioensayo en ratón) la infectividad del prion (Supattapone y col., 2001). Las poliaminas ramificadas son el primer tipo de compuestos que se ha mostrado efectivo para eliminar la “infección” prionica en un tipo concreto de células vivas. Aunque es difícil extrapolar conocimientos a otras situaciones, hallazgos de esta índole pueden ofrecer interesantes perspectivas en futuros estudios de eliminación de priones de diversas matrices o terapia de la enfermedad.

- Establecimiento de la cinética de destrucción térmica.** No es fácil entender la gran termorresistencia que presentan los priones, muy superior a la de las formas esporuladas de las bacterias e incluso a la de las proteasas y lipasas termorresistentes de las bacterias psicrotrofas que son decenas de veces más termorresistentes que las esporas de *Bacillus stearothermophilus* (Kroll, 1989) y no se desactivan siquiera por los tratamientos UHT aplicados para conseguir la esterilidad comercial en la leche. Siendo una proteína ¿qué mecanismo opera en los priones para estar dotados de esa gran termorresistencia? Los artículos de Taylor (1999, 2000) ofrecen numerosos datos de su grupo y de otros autores acerca de la termoestabilidad de diversas variedades de agentes de las EET. Sin embargo, el análisis de los datos no permite extraer resultados precisos para establecer la cinética de destrucción térmica porque, por una parte, no se ofrecen parámetros comparables de las experiencias citadas y, por otra, son diversas las cepas y las metodologías utilizadas para llegar a los resultados. Además, en muchas ocasiones sólo se indica si, tras el tratamiento, se ha logrado la “desactivación” o no de los priones, sin definir en términos matemáticos el significado de “desactivación” o “no desactivación”. Lo más conveniente parece, pues, estudiar dicha cinética en un intervalo práctico (p.e. entre 80 y 150 °C), determinando el orden de la reacción y los parámetros que definen su termodesactivación. Así, se podrán fijar las condiciones precisas de desactivación.
- Desnaturalización/precipitación.** Anteriormente se ha comentado que el prion es resistente a pH extremos y a disolventes orgánicos. Sin embargo, hay algunos agentes a los que parece mostrar cierta sensibilidad, el tratamiento con fenol saturado, exposición a NaOH 2M o a un 10% de SDS (Taylor y col., 1994; Taylor y Fernie, 1996). También se ha informado que el uso de una solución de hipoclorito sódico desactiva el agente de la EEB (Taylor, 1998) aunque otros autores no opinan lo mismo (Brown, 1998). Igualmente se ha utilizado urea 6M para desorganizar su conformación (Fischer y col., 2000) y recientemente se ha indicado que los compuestos del grupo pentosan polisulfato se podrían usar como agentes profilácticos contra la vCJD (IFST, 2001). Hay otros agentes a los que la bibliografía no hace referencia y, sin embargo, se utilizan con mucha frecuencia en los laboratorios para desproteinizar. Entre ellos, cabe citar el ácido tricloroacético que es un agente que universalmente se utiliza para precipitar las proteínas de diversas matrices, entre ellas las alimentarias. En este grupo se podrían también citar el etanol o el ácido perclórico que se emplean para desproteinizar muestras para el posterior análisis de, por ejemplo, aminos y aminoácidos. Es probable que, en caso de que el prion sea sensible a agentes de esta naturaleza no se puedan utilizar de forma general por la agresividad del tratamiento pero sí puede proporcionar información para conocer mejor la sensibilidad del prion frente a otros agentes o incluso podrían ser útiles, por sí mismos o en combinación con otros métodos, para el tratamiento de ciertos residuos o para la descontaminación de algunos utensilios como, por ejemplo, el material de neurocirugía.
- Proteasas.** De forma genérica se ha descrito (Brown y col., 1990) que el prion es muy resistente a la acción de proteasas. Probablemente, dentro del término “proteasas” se refieren exclusivamente a las proteinasas y así se indica, por ejemplo, en el caso de la proteinasa K (Race y col., 1998). Hay cuatro tipos diferentes de

enzimas de esta naturaleza y en cada tipo hay, unas, con actividades más bien inespecíficas y, otras, con acusada especificidad sobre ciertos enlaces peptídicos. Quizás convendría ampliar las investigaciones acerca de la sensibilidad del prion a otras endopeptidasas.

Puede decirse, en conjunto, que deberían ampliarse las investigaciones para intentar desactivar el agente infeccioso de una forma segura. La relevancia mayor de este apartado cae de lleno en el tratamiento de los residuos de reses afectadas por la EEB e, incluso, de los productos sospechosos. Es de gran importancia la descontaminación de estos materiales porque el prion, además de su resistencia a agentes desestabilizantes, parece que puede permanecer infeccioso durante 2 –3 años en el suelo (Taylor y col., 1994; Brown, 1998).

### **V.3. Detección de material nervioso (médula espinal y nervios adyacentes) y ganglios espinales en carne.**

Ya se ha comentado más arriba la problemática de la separación de las partículas cárnicas de los soportes óseos localizados en la espina dorsal o en regiones cercanas y, de forma especial, la carne deshuesada mecánicamente. La carne contaminada con material clasificado como “muy infeccioso” es, por supuesto, inaceptable para el consumo humano directo y también como ingrediente para la preparación de derivados cárnicos. Recientemente, se han desarrollado algunas pruebas con esta finalidad. Una de ellas está basada en la determinación de colesterol en la muestra (Nitsch y Wachsmann, 2000) pero los resultados no son claros cuando la concentración de tejido cerebral o espinal es baja (p.e. 5%) y, por otra parte, no es posible diferenciar el tejido nervioso de vacuno del de otros animales, como el cerdo. Otra de las pruebas desarrolladas (Wenisch y col., 2000) se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales frente a una enolasa (EC 4.2.1.11) específica de las neuronas pero tiene el inconveniente de perder una gran parte de su reactividad inmunológica en alimentos estabilizados térmicamente, como salchichas frankfurt y similares. Quizás, puedan idearse otras posibilidades, por ejemplo, derivadas de los diferentes tipos de esfingolípidos y ceramidas existentes en el tejido nervioso, bien por vía instrumental o por vía inmunológica. Aunque esos lípidos no se comportan como antígenos se pueden fijar a antígenos conocidos y preparar, después, anticuerpos específicos.

### **V.4. Trazabilidad.**

El Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria contempla los futuros desarrollos en la UE para proteger al máximo la salud del consumidor. Entre ellos están los nuevos sistemas para marcar los alimentos. Ya se ha descrito uno inmunológico para identificar los animales y los alimentos desde el origen; está basado en la vacunación de los animales con péptidos sintéticos que, lógicamente, inducirían la formación de anticuerpos que podrían detectarse en sangre, leche, carne, etc. mediante inmunoensayos (Gareis y Groschup, 1998). Quizás pueda ocurrir como en la detección de partículas de sistema nervioso en carne, es decir, que disminuya la reactividad inmunológica en los alimentos tratados por el calor. Se ha propuesto también la introducción de “microchips”. Los sistemas de trazabilidad también requieren de la identificación de la especie animal, no sólo de la materia prima sino también de los ingredientes utilizados. Existen varios kits en el mercado basados en primers de

DNA pero no están bien establecidos cuales son sus niveles de detección y las interferencias que pueden existir en matrices tan complejas como los productos alimenticios elaborados. En cualquier caso, las circunstancias parecen forzar a idear algún método que permita seguir el rastro fácilmente a los ingredientes y aditivos en un producto alimenticio. En definitiva, lo que se ha venido en llamar trazabilidad “desde la granja hasta la mesa”.

#### **V.5. Evitar que el prion ingrese a la cadena alimentaria.**

Es, sin duda, el objetivo global más importante de las investigaciones en relación con la Seguridad Alimentaria. Es necesario identificar los puntos críticos dónde, cuándo y cómo actuar dentro del largo recorrido desde la alimentación del animal hasta que sus productos se distribuyen en el sector alimentario.

## **VI. ACRÓNIMOS**

**CDC:** Comité director científico.

**CJD:** Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

**EEB:** Encefalopatía espongiforme bovina.

**EET:** Encefalopatía espongiforme transmisible.

**F<sub>0</sub>:** Tiempo de un tratamiento térmico a 121 °C para conseguir el efecto deseado.

**HCH:** Harina de carne y hueso.

**IFST:** Institute of Food Science and Technology.

**MER:** Material específico de riesgo.

**OMS:** Organización mundial de la salud.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PrP<sup>f</sup>:** Prion normal.

**PrP<sup>sc</sup>:** Prion infeccioso.

**SEAC:** Spongiform Encephalopathy Advisory Committee.

**SDS:** Sodium dodecyl sulphate.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**UE:** Unión europea.

**UHT:** Alta temperatura, tiempo corto.

**UI:** Unidad de infectividad.

**vCJD:** Nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi, A. y Weissmann, C. (1997) Prion research: the next frontier. *Nature* 389, 795-798.
- Anderson, R.M., Donnelly, C.A., Ferguson, N.M., Woolhouse, M.E.J., Whatt, C.J., Udy, H.J., McWhinney, S., Dunstan, S.P., Southwood, T.R.E., Wilesmith, J.W., Ryan, J.B.M., Hoinville, L.J., Hillerton, J.E., Austin, A.R. y Wells, G.A.H. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 383, 779-788.
- Andrews, N.J., Farrington, C.P., Cousen, S.N., Smith, P.G., Ward, H., Knight, R.S.G., Ironside, J.W. y Will, R.G. (2000) Incidence of variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 356, 481-482.
- Anónimo (2000) Gelatin replacement a bitter sweet debate. *Confect. Produc.* 66, 16-17.
- Balter, M. (2000) Tracking the human fallout from “mad cow disease”. *Science* 289, 1452-1454.
- Baranes, D., Ledeerfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H. y Kandel, E.R. (1998) Tissue plasminogen activator contributed to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway. *Neuron* 21, 813-825.
- Blanchfield, J.R. (1999) Bovine spongiform encephalopathy (BSE) – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 33, 81-97.
- Brewer, M.S. (2001) Bovine spongiform encephalopathy- Food safety implications. *Adv. Food Res. Nutr.* 43, 265-317.
- Brown, P. (1998) BSE: the final resting place. *Lancet* 351, 1146-1147.
- Brown, P., Libwerski, P.P., Wolff, A. y Gajdusek, D.C. (1990) Conservation of infectivity in purified fibrillary extract of scrapie infected hamster brain after sequential enzymatic digestion of polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 7664-7671.
- Brown, P., Gibbs, C.J., Rodgers-Johnson, P., Asher, D.M., Sulima, M.P., Bacote, A., Goldfarb, L.G. y Gajdusek, D.C. (1994) Human spongiform encephalopathy –The National Institute Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Am. Neurol.* 35, 513-519.
- Brown, P., Will, R.G., Bradley, R. Asher, D.M. y Detwiler, L. (2001) Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: Background, evolution, and current concerns. *Emerg. Infec. Dis.* 7, 6-16.
- Bruce, M., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Cousen, S., Fraser, H. y Bostok, C.J. (1997) Transmissions to mice indicate that new variant CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 448-450.
- Cawthorne, R.J.G. (1997) Failure to confirm a TSE [transmissible spongiform encephalopathy] in chickens. *Vet. Rec.* 141, 203.
- CDC (1998) European Commission. Scientific Steering Committee. *Opinion on the risk of infection of sheep and goats with bovine spongiform encephalopathy agent.* Adopted on September 1998. [http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)
- CDC (1999) European Commission. Scientific Steering Committee. *Opinion on the human exposure risk (HER) via food with respect to BSE.* Adopted on 10 December 1999. [http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)
- CDC (2000) European Commission. Scientific Steering Committee. *Opinion on specified risk materials of small ruminants (follow-up to the SSC opinion of 24 25 September 1998 on the risk of infection of sheep and goats with BSE agent).* Adopted on 13 – 14 April 2000. [http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)
- CDC (2000a) European Commission Scientific Steering Committee. Scientific report and opinion on the safety of gelatine. Update by SSC on 20–21 January 2000. [http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)
- CDC (2000b) European Commission. Scientific Steering Committee. *Opinion of quantitative risk assessment on the use of the vertebral column for the production of gelatine and tallow.* Adopted on 13–14 April 2000. [http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)
- CDC (2001) European Commission. Scientific Steering Committee. *Safety of milk with regard to TSE.* [http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome\\_en.html](http://europe.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/outcome_en.html)
- Codex Alimentarius. (1969) CAC/RS31-1969 y CAC/RS30-1969.
- Cohen, F.E. y Prusiner, S.B. (1998) Pathologic conformation of prion proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 67, 793-819.
- Collee, J.G. y Bradley, R. (1997) BSE a decade on-part. *Lancet* 349, 715-721.

- Collinge, J., Palmer, M.S. y Sidle, K.C.L. (1995) Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 343, 371-378.
- Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J. y Hill, A.F. (1996) Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD. *Nature* 383, 685-690.
- Dawson, M., Wells, G.A.H., Parker, B.N.J. y Scott, A.C. (1991) Transmission studies of BSE in cattle, hamsters, pigs and domestic fowl. Proceedings of the seminar of *Sub acute spongiform encephalopathies*, Brussels, 12-14 November 1990. pp 25-32.
- Dealer, S. (1993) Bovine spongiform encephalopathy (BSE): the potential effect of the epidemic on the human population. *Br. Food J.* 95, 22-34.
- Dugan, L.R. (1987) Meat animal by-products and their utilisation. En "The science of meat and meat products. J.F. Price and B.S. Schweigert (eds.). Food and Nutrition Press. Westport. USA.
- Figueras, A. (2001) Proyecto FAIR-CT97-3308: "Separation, identification and characterization of the normal and abnormal isoforms of prion protein from normal and experimentally infected fish"
- Fischer, M.B., Roeckl, C., Parizaek, P., Schwarz, H.P. y Aguzzi, A. (2000) Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 408, 479-483.
- Gareis, M. y Groschup, M.H. (1998) Immunological marking of animals origin as alternative identification of origin. *Fleischwirtschaft* 78, 764, 766-767, 800.
- Ghani, A.C., Ferguson, N.M., Donnelly, C.A. y Anderson, R.M. (2000) Predicted vCJD mortality in Great Britain. *Nature* 406, 583-584.
- Grobben, A., Taylor, D. y Steele, P.J. (2001) Preliminary data on the inactivation of TSE agents by a short NaOH treatment in the acid bone gelatine manufacturing process (En prensa). Citado en: "European Commission. Scientific Steering Committee. *Opinion and report on safety with respect to TSE risks of collagen produced from ruminant hides* Adopted December 1999. Adopted by the SSC on 10-11 May 2001. [http://europa.eu.int/comm/food/ssc/outcome\\_en.html](http://europa.eu.int/comm/food/ssc/outcome_en.html)
- Helcke, T. (2000) Gelatin- the ingredient with aptitude. *Eur. Food Drink. Rev.* 37, 39-41.
- Hermann, L.M., Davis, W.C., Knowles, D.P., Wardrop, K.J., Gambetti, P. y O'Rourke, K.I. (2001) Cellular prion protein is expressed on peripheral blood mononuclear cells but no platelets of normal and scrapie-infected sheep. *Haematologica* 86, 146-153.
- Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K.C.L., Gowland, I., Collinge J., Doey, L.J. y Lantos, P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448-450.
- Hill, A.F., Joiner, S., Desbruslais, M., Lantos, P. y Collinge J. (2000) Species-barrier- independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 97, 10248-10253.
- Hoinville, L.J., Wilesmith, J.W. y Richards, M.S. (1995) An investigation of risk factors for cases of bovine spongiform encephalopathy born after the introduction of the "fed ban". *Vet. Rec.* 136, 312-318.
- Houston, F., Foster, J.D., Chong, A., Hunter, N. y Bostock, C.J. (2000) Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356, 999-1000.
- Howard, A.L. (1996) Creutzfeldt-Jakob disease in a young woman. *Lancet* 347, 945-948.
- IFST (Institute of Food Science and Technology) (1996) IFST position statement: bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Food Sci. Technol. Today* 10, 231-243.
- IFST (Institute of Food Science and Technology) (1999) Bovine spongiform encephalopathy (BSE): Part 1/2. Scientific opinion. <http://www.ifst.org/hottop5.html>
- IFST (Institute of Food Science and Technology) (2001) Bovine spongiform encephalopathy (BSE): Part 1/2. Scientific opinion. <http://www.ifst.org/hottop5.html>
- Inveresk Research International (1998) Letter of 7 January 1998 from A. Shepherd to J. Thomsen (G.M.E.) on the reduction factors of scrapie infectivity during the various step of gelatine production. Citado en la ref. "CDC (2000)".
- Kimberlin, R.H. (1994) Proceeding of a Consultation on BSE with the Scientific Veterinary Committee of the Commission of the European Communities. Sept, 1993. En: Bradley and Marchant (eds). 1997. "A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie". *Nature* 390, 687-690.
- Kroll, S. (1989) Thermal Stability. En "Enzymes of psychrotrophs in raw foods" R.C. McKellar (ed.). CRC Press, FL.
- MAFF (1997) Spongiform encephalopathy Advisory Committee. SEAC. Meeting Public Summary. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Surrey. England.
- Madani, R., Hulo, S., Toni, N., Madani, H., Steimer, T. Muller, D. y Vassalli, J.D. (1999) Enhanced hippocampal long term potentiation and learning by increased neuronal expression of tissue-type plasminogen activator in transgenic mice. *EMBO J.* 18, 3007-3012.

- Marsh, R.F. y Bensen, R.A. (1993) Epidemiological and experimental studies on transmissible mink encephalopathy. *Dev. Biol. Stand.* 80, 111-118.
- Narang, H. (1997) Failure to confirm a TSE [transmissible spongiform encephalopathy] in chickens. *Vet. Rec.* 141, 255-256.
- Nitsch, P. y Wachsmann, G. (2000) Detection of spinal cord or brain in meat mixtures using the cholesterol testkit "Enzyme bioanalysis cholesterol/R-Biopharm" *Mitt. Bundes. Fleisch-Kulmbac.* 39, 797-802.
- Palmer, M.S. y Collinge, L. (1993) Mutation and polymorphisms in the prion protein gene. *Hum. Nutr.* 2, 168-173.
- Prusiner, S.B. (1995) Prion diseases. *Sci. Am.* 272, 48-57.
- Purdey, M. (2000) Ecosystems supporting clusters of sporadic TSEs demonstrate excesses of the radical-generating divalent cation manganese and deficiencies of antioxidant co factors Cu, Se, Fe, Zn: Does a foreign cation substitution at prion's Cu domain initiate TSE? *Med. Hypotheses* 54, 278-306.
- Race, R., Jenny, A. y Sutton, D. (1998) Scrapie infectivity and proteinase K resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: Implication for transmission and antemortem diagnosis. *J. Infect. Dis.* 178, 949-953.
- Ridley, R.M., Baker, H.F. y Windle, C.P. (1996) Prion disease:  $\zeta$ transmission from mad cows. *Curr. Biol.* 6, 1247-1249.
- Rogers, P. (2000) Gelatin.- tried and true. *Can. Inds.* 165, 41-43.
- Saborio, G.P., Permann, B. y Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813.
- Schoon, H.A., Brunckhorst, D. y Pohlenz, J. (1991) Spongiform encephalopathy in an ostrich (*Struthio camelus*). A case report. *Tierarztl. Prax.* 19, 263-265.
- Schrieber, R. y Seybold, U. (1993) Gelatine production, the six step to maximum safety. *Dev. Biol. Stand.* 80, 195-198.
- Shepherd, A. (1999) Validation of the clearance of scrapie from the manufacturing process of gelatine. Interim data summary of the Inveresk Research International Project N° 855028 sponsored by Gelatine Manufactures Europe. Report N° 14682. Inveresk Research International. Tratent. Scotland. Citado en la ref. "CDC (2000)".
- Stoeckel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E. y Prusiner, S.B. (1998) Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry* 37, 7185-7193.
- Supattapone, S., Nguyen-Hoang-Oanh, B., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. y Scott, M.R (1999) Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14529-14534.
- Supattapone, S., Prusiner, S.B. y Scott, M.R (2001) Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J. Virol.* 75, 3453-3461.
- Taylor, D.M. (1996) Inactivation studies on BSE agent. *Br. Food J.* 98, 36-39.
- Taylor, D.M. (1998) Inactivation of the BSE agent. *J. Food Safety* 18, 265-274.
- Taylor, D.M. (1999) Inactivation of prions by physical and chemical means. *J. Hosp. Infect.* 43, (suppl) S69-S76.
- Taylor, D.M. (2000) Inactivation of transmissible degenerative encephalopathy agents: A review. *Vet. J.* 159, 10-17.
- Taylor, D.M. y Fernie, K. (1996) Exposure to autoclaving or sodium hydroxide extends the dose-response curve of the 263K strain of scrapie agent in hamsters. *J. Gen. Virol.* 77, 811-813.
- Taylor, D.M., Fraser, H., McConell, I. y Brown, D.A. (1994) Decontamination studies with agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch. Virol.* 139, 313-326.
- Taylor, D.M., Ferguson, C.E., Bostock, C.J. y Dawson, M. (1995) Absence of disease in mice receiving milk from cows with bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Vet. Rec.* 136, 592-596.
- Wenisch, S., Luecker, E., Eigenbrodt, E., Buelte, M. y Leiser, R. (2000) Histological and immunohistological procedures for the detection of central nervous tissue in meat products. *Fleischwirtschaft* 80, 69-72.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousen, S., Estibeiro, H., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. y Smith, P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.
- Wood, J., McGill, I., Done, S. y Bradley, R. (1997) Neurology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1998 – 1991. *Vet. Rec.* 140, 167-174.
- Wuthrich, K. (1996) Citado en "Brewer, M.S. (2001) Bovine spongiform encephalopathy- Food safety implications. *Adv. Food Res. Nutr.* 43, 265-317."

Zeidler, M. e Ironside, J.W. (2000) The new variant of Creutzfeldt-Jakob disease. *Rev. Sci. Technol. Off. Int. Epiz.* 19, 98-120.