



universidad
de león

Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal

**Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias y de los
Alimentos**

Tema de tesis para optar al grado de Doctor:

**“Patologías nerviosas emergentes en caprinos: Louping ill e
intoxicación por plantas *Ipomoea* spp”**

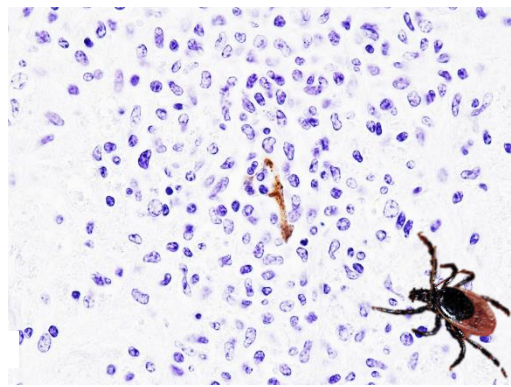
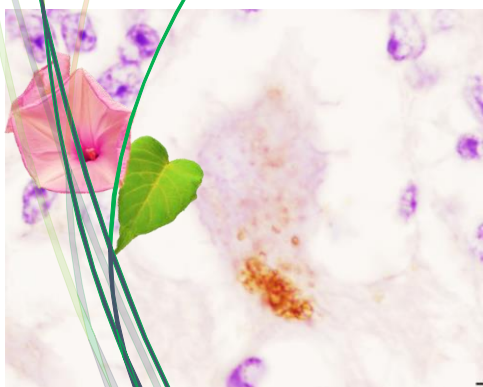
Presentado por:

Luis Manuel Salinas Rodríguez

Directores:

Dra. D. Ana Balseiro Morales

Dr. D. Juan Francisco García Marín



León, España. 2019



Facultad de Veterinaria
Departamento de Sanidad Animal

Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias y de los
Alimentos

Tema de tesis para optar al grado de Doctor:

**“Patologías nerviosas emergentes en caprinos: Louping ill e
intoxicación por plantas *Ipomoea* spp”**

Presentado por:

Luis Manuel Salinas Rodríguez

Directores:

Dra. D. Ana Balseiro Morales.

Dr. D. Juan Francisco García Marín.

León, España, 2019

“El científico no estudia la naturaleza por la utilidad que le pueda reportar; la estudia por el gozo que le proporciona, y este gozo se debe a la belleza que hay en ella...la belleza intelectual se basta a sí misma, más que quizá por el bien futuro de la humanidad, por lo que el científico consagra su vida a un trabajo largo y difícil”.

Henri Poincaré

“No existe vacío más absoluto y aterrador que el de la página en blanco. El miedo a lanzarse a la nada tecleando la primera letra de una palabra...”

Sergio Ramírez.

Agradecimientos:

Este trabajo se realizó gracias al proyecto financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), número de referencia ERTA2013-00013-C04-04 (cofinanciado por FEDER) y la División de Ciencia Rural y Ambiental y Servicios de Analítica (RESAS) del Gobierno de Escocia. También debo agradecer a la Universidad de León y al SERIDA, así como a sus equipos de investigación, que me admitieron y facilitaron un espacio, tiempo, instalaciones, equipos y material para desarrollar este trabajo y poder cumplir con este sueño. Gracias al soporte técnico brindado por R. González (SERIDA), C. Underwood y V. Forbes (Instituto de Investigación Moredun) y a U. Munderloh (Universidad de Minnesota) por proporcionar las células ISE6 de *I. scapularis*.

El desarrollo y conclusión de estos trabajos de tesis no se hubiese logrado sin el apoyo incondicional, coordinación y esfuerzo conjunto de la Dra. Ana Balseiro Morales y el Dr. Juan Francisco García Marín, docentes e investigadores de la Universidad de León, quienes me dieron ese voto de confianza y el mapa a seguir para encontrar ese tesoro que esconde la investigación científica. También por el apoyo brindado por el equipo docente de Patología Veterinaria de la Universidad de León, personas muy dedicadas en ese arduo trabajo de la formación en Investigación.

A mis padres, mis hermanas, a ti Lilja, y a toda mi familia por el apoyo incondicional, porque supieron sobrellevar y comprender esos momentos que estuve desconectado y lejos de todo, por ese tiempo y espacio que me dieron y que no pude compartir con ustedes para poder lograr este objetivo.

Gracias, a la doctora María Teresa Llamazares de la Universidad de León por su apoyo incondicional, al padre Gregorio Barreales que gracias a su gestión y contacto inicial con la Universidad de León pude iniciar este camino de la investigación científica. Gracias a la dirección de la UNIAV en Nicaragua, universidad en la que recibí apoyo absoluto para asistir a mis estudios; gracias a los amigos y personas que me apoyaron y confiaron en mí, que como ven no puedo escribir el nombre de todos por falta de espacio en esta hoja.

Muy agradecido con Dios por dejarme ser, porque me situó en este momento y reunió a todas estas personas que aportaron con su conocimiento a mi formación profesional...

¡Simplemente...Gracias!

CONTENIDO

I. ABREVIATURAS	3
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
III. RESUMEN	7
IV. INTRODUCCIÓN	9
1. GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	10
<i>1.1. Las unidades estructurales del sistema nervioso y su función</i>	10
<i>1.2. Signos neurológicos según la localización de la lesión en el SNC</i>	11
2. CAUSAS DE LESIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO (SN) EN RUMIANTES Y OTROS ANIMALES	13
<i>2.1. Traumatismos</i>	13
<i>2.2. Neoplasias</i>	13
<i>2.3. Enfermedades metabólicas y nutricionales</i>	13
2.3.1. <i>Poliencefalomalacia</i>	13
2.3.2. <i>Ataxia enzoótica</i>	14
<i>2.4. Alteraciones congénitas</i>	14
2.4.1. <i>Degeneraciones (abiotrofias) en cabras</i>	15
2.4.2. <i>Enfermedades por almacenamiento lisosomal en cabras y ovejas</i>	16
<i>2.5. Enfermedades que desencadenan reacciones inflamatorias específicas del SNC</i>	20
2.5.1. <i>Reacción del SN frente a las infecciones</i>	20
2.5.2. <i>Procesos inflamatorios causados por virus, priones, bacterias y parásitos en el SN de cabras y otros animales</i>	22
<i>2.6. Louping ill (LI)</i>	24
2.6.1. <i>Etiología. Clasificación del virus</i>	25
2.6.2. <i>Epidemiología</i>	26
2.6.3. <i>Distribución geográfica</i>	27
2.6.4. <i>Transmisión</i>	29
2.6.5. <i>Periodo de incubación</i>	31
2.6.6. <i>Especies afectadas</i>	32
2.6.7. <i>Casos de infección en humanos</i>	34
2.6.8. <i>Cuadro clínico de LI en diferentes especies</i>	35
2.6.9. <i>Cuadro lesional</i>	37
<i>a. Lesiones macroscópicas</i>	37

<i>b. Lesiones microscópicas</i>	37
2.6.10. <i>Respuesta inmune</i>	38
2.6.11. <i>Morbilidad y mortalidad</i>	38
2.6.12. <i>Diagnóstico</i>	39
<i>a. Diagnóstico clínico</i>	39
<i>b. Diagnóstico diferencial</i>	39
<i>c. Recolección de muestras</i>	40
<i>d. Pruebas de laboratorio</i>	40
2.6.13. <i>Control</i>	41
2.7. Agentes tóxicos como causa de alteraciones nerviosas en cabras	42
2.7.1. <i>Plantas tóxicas</i>	42
2.7.2. <i>Alteraciones neurológicas provocadas en cabras por el consumo de plantas del género Ipomoea</i>	44
V. OBJETIVOS	48
1. Objetivos generales	49
2. Objetivos específicos	49
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	50
1. Infección experimental con Spanish Goat Encephalitis virus (SGEV)	51
1.1. <i>Selección y tratamiento de los animales</i>	51
1.2. <i>Protocolo de infección experimental con SGEV usado en cabritos y corderos</i>	52
1.3. <i>Período de estudio, toma de muestras y evaluación de signos clínicos de los cabritos y corderos infectados experimentalmente</i>	52
1.4. <i>Estudios realizados en los cabritos y corderos infectados con SGEV</i>	53
2. Estudio patológico en cabras con síndrome neurológico en Nicaragua	53
2.1. <i>Animales seleccionados para el estudio</i>	53
2.2. <i>Recolección de datos, muestras para análisis y técnicas diagnósticas</i>	53
3. Análisis estadístico	54
VII. TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS CIENTÍFICAS	56
1. Trabajo #1. Vaccination against Louping Ill Virus Protects Goats from Experimental Challenge with Spanish Goat Encephalitis Virus.....	57
<i>Summary</i>	57
<i>Introduction</i>	58
<i>Material and Method</i>	59

Experimental Animals.....	59
Culture of SGEV	59
Vaccination and SGEV Challenge	60
Sampling, Serology and Evaluation of Clinical Signs	60
One-step TaqMan Real-Time qRT-PCR Assay	60
Post-mortem Examination.....	61
Statistical Analyses	63
<i>Results</i>	63
Clinical Findings	63
Serology	65
Pathology and Immunohistochemistry.....	67
SGEV RNA Load.....	69
<i>Discussion</i>	69
<i>Acknowledgments</i>	74
<i>Conflict of Interest Statement</i>	75
<i>References</i>	75
2. Trabajo #2. Lambs are Susceptible to Experimental Challenge with Spanish Goat Encephalitis Virus	78
<i>Summary</i>	78
<i>Introduction</i>	79
<i>Material and method</i>	79
Experimental Animals.....	79
Culture of SGEV and Experimental Challenge	80
Serum Sampling, Serology and Evaluation of Clinical Signs	80
Real-time Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction	82
Post-mortem Examination and Immunohistochemistry.....	82
Statistical Analyses	83
<i>Results</i>	84
Clinical Findings	84
Serological Studies.....	85
Pathology and Immunohistochemistry.....	86
SGEV RNA Load.....	89
Correlation of Variables	90
<i>Discussion</i>	91

<i>Acknowledgments</i>	94
<i>Conflict of Interest Statement</i>	94
<i>References</i>	94
3. Trabajo #3. Neurological syndrome in goats associated with <i>Ipomoea trifida</i> and <i>Ipomoea carnea</i> containing calystegines	96
<i>Abstract</i>	96
<i>Ethical statement</i>	104
<i>Acknowledgements</i>	104
<i>Transparency document</i>	105
<i>Appendix A. Supplementary data</i>	105
<i>Funding sources</i>	105
<i>Conflicts of interest</i>	105
<i>References</i>	105
VIII. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS	109
1. Discusión de resultados de la infección experimental con SGEV	110
<i>Objetivo 1</i>	110
<i>Objetivo 2</i>	113
<i>Objetivo 3</i>	119
2. Discusión de resultados obtenidos para el estudio patológico de las alteraciones nerviosas en cabras en Nicaragua	121
<i>Objetivo 4</i>	121
3. Sugerencias para el control de SGEV y las alteraciones nerviosas en cabras	123
<i>Objetivo 5</i>	123
3.1. Sugerencias para un buen control de SGEV en la Península Ibérica	123
3.2. Sugerencias para el control de las alteraciones neurológicas en cabras de Nicaragua	125
IX. CONCLUSIONES GENERALES	126
X. BIBLIOGRAFÍA	129

I. ABREVIATURAS

- ABC: Complejo de inmunoperoxidasa avidina-biotina.
- Ac: Anticuerpo.
- ARN: Ácido ribonucleico.
- BHE: Barrera hematoencefálica.
- CAE: Artritis encefalitis caprina.
- CR3, CR4: Receptores de membrana.
- EEB: Encefalopatía espongiiforme bovina.
- EIO: Encefalomiелitis infecciosa ovina (sinonimia de Louping ill).
- ELISA: Enzima ligada a inmunoensayo.
- FDA: Food and drug administration.
- Fig.: Abreviatura que hace referencia a figura.
- GFAP: Proteína glial ácida fibrilar.
- H: E: Tinción histológica Hematoxilina Eosina.
- ID: Identificación de cada individuo según número asignado.
- IgG: Inmunoglobulina G.
- IgM: Inmunoglobulina M.
- IHC: Inmunohistoquímica.
- IV: Intravenoso (vía de aplicación de medicamento).
- LCR: Líquido ceforraquídeo.
- LI: Abreviaturas que hacen referencia a la enfermedad Louping ill.
- LIV: Louping ill virus (Virus louping ill en inglés).
- ME: Médula espinal.
- MEC: Médula espinal cervical.
- NC: Nervio craneal.
- NS1, NS2A, NS2B, NS4, NS4A, NS4B, NS5: Nomenclatura usada para nombrar las proteínas de premembrana viral.
- PEM: Poliencfalomalacia.
- PFU/ml: Unidades preformadas de proteínas por mililitro.
- prM: Proteína de premembrana viral.
- RNA: Ácido ribonucleico (en inglés).
- RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (en inglés).
- SC: Subcutáneo (vía de aplicación de medicamentos).

SGEV: Virus de la encefalomiелitis caprina española (en inglés).
SN: Sistema nervioso.
SNC: Sistema nervioso central.
SPSS: Programa estadístico para programas de salud (en inglés).
SSEV: Virus de la encefalitis de las ovejas españolas (en inglés).
TBE: Encefalitis transmitida por garrapatas (en inglés).
TBEV: Virus de las encefalitis transmitidas por garrapatas (en inglés).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Algunas de las enfermedades que se presentan en los animales y que suelen causar lesiones en el sistema nervioso central (SNC) se caracterizan por una manifestación clínica neurológica muy variada que depende de la intensidad de la lesión y de la zona afectada (Summers et al, 1995; Pugh 2002). Muchas de estas enfermedades suelen ser propias del SNC y otras son la consecuencia de procesos sistémicos que pueden afectar al tejido nervioso, en ambos casos los signos clínicos derivan directamente de las lesiones localizadas en el SNC. En las cabras estas enfermedades neurológicas pueden tener un origen infeccioso, parasitario, carencial o toxicológico (Pusterla et al, 1999).

Una enfermedad infecciosa es el Louping ill (LI), que se ha descrito en ovejas de Escocia desde el siglo XVIII en la que su transmisión se ha relacionado con la distribución del vector primario, la garrapata *Ixodes ricinus* (Jeffries et al, 2014). En septiembre de 2011, en un grupo de cabras de la región sur de Asturias (España) se presentó esta enfermedad caracterizada por alteraciones neurológicas, fiebre bifásica, depresión, ataxia, incoordinación muscular, temblores, parálisis de la parte posterior del cuerpo, coma y muerte. El agente aislado fue clasificado como una nueva variante de LI a la que se denominó “*Spanish Goat Encephalitis Virus*” (SGEV) (Balseiro et al, 2012).

El virus LI pertenece al género *Flavivirus*, virus que son transmitidos por artrópodos (arbovirus), e incluye diferentes virus que pueden causar encefalitis como el virus del Nilo Occidental, el virus del dengue, el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), o el virus de la fiebre amarilla. Los arbovirus se caracterizan porque tienen un amplio abanico de anfitriones, están distribuidos por todo el mundo, y en humanos producen un amplio cuadro clínico que va desde la infección asintomática a la encefalitis fulminante o la fiebre hemorrágica (Murphy et al, 1999). La presencia de esta nueva variante de LI y su presentación clínica en un nuevo huésped, son razones suficientes para profundizar en los estudios patogénicos, anatomopatológicos y serológicos, los que serán imprescindibles para el establecimiento de un protocolo de diagnóstico y de medidas de acción para el control de esta enfermedad.

En el caso particular de Nicaragua, a partir de 2007, se ha observado en las cabras de la región de Malpaisillo (León), un cuadro clínico caracterizado por ataxia, afectando

principalmente al tercio posterior con serias limitaciones en la marcha de estos animales, así como nistagmos, paresia y tremor (temblores). El porcentaje de afectados se desconoce no provocando mortalidad directa; algunos de los animales afectados sobreviven mucho tiempo, otros mueren consecuencia de las complicaciones por el decúbito o porque son sacrificados. Los animales supervivientes con signos neurológicos no pierden el apetito, pudiendo incluso algunas hembras quedar gestantes y tener crías completamente sanas. La presentación del síndrome no se delimita a una época del año, afectando animales de todas las edades, con mayor incidencia en adultos.

La causa de este problema aún no se ha podido definir, en el que se han propuesto infecciones como artritis encefalitis caprina (CAE), scrapie, así como deficiencias de minerales e intoxicación por plantas. También se puede sugerir la presencia de un *Flavivirus*, ya que el país presta las condiciones climáticas y están presentes los vectores que favorecen el desarrollo y establecimiento de enfermedades causadas por estos virus. El mejor ejemplo son las enfermedades emergentes Zika y Chikungunya, recientemente establecidas en la región de las Américas, favorecidas por la internacionalización del comercio, el cambio climático y el comportamiento humano. La epidemiología de estos virus y otras enfermedades nos indica que “*El Mundo hoy en día es más vulnerable que nunca*” (Frieden, 2014), y que debemos colaborar de manera eficaz para construir capacidad y responder de manera efectiva para encontrar rápidamente nuevas enfermedades, brotes y amenazas dondequiera que surjan con el fin de dar un diagnóstico acertado y tomar las medidas pertinentes (OPS/OMS, 2018).

III. RESUMEN

Esta tesis doctoral incluye artículos que responden a una serie de preguntas de interés sanitario que surgieron a partir del brote de Louping ill (LI) en cabras en el norte de España, así como de un proceso patológico observado en cabras de Nicaragua. La primera pregunta fue: ¿La vacuna comercial frente a LI diseñada para ovinos resulta efectiva en caprinos? Los resultados obtenidos y que dan respuesta a esta pregunta se publicaron en un primer artículo denominado “*Vaccination against Louping Ill Virus Protects Goats from Experimental Challenge with Spanish Goat Encephalitis Virus (SGEV)*”. Se demostró que la aplicación de la vacuna aprobada para LI en ovinos resultó 100% efectiva en la inmunización de cabritos contra la nueva variante de LI denominada SGEV. Durante el estudio se pudo comprobar el desarrollo de inmunidad ya que los niveles de IgG de los cabritos aumentaron constantemente incluso después de la segunda dosis de vacuna, previniendo de esta manera la presentación de signos clínicos y el desarrollo de lesiones histológicas asociadas a la enfermedad, asimismo la carga de ARN viral se redujo a niveles muy bajos difícilmente detectables mediante PCR-qRT, resultados que indican que la vacunación es la mejor manera de prevenir la transmisión de esta enfermedad.

La segunda pregunta planteada fue: ¿La nueva variante de LI solamente afecta al ganado caprino o también afecta al ganado ovino como sucede en el Reino Unido? Esta pregunta es respondida en el artículo denominado “*Lambs are Susceptible to Experimental Challenge with Spanish Goat Encephalitis Virus*”. El SGEV es capaz de provocar en el ganado ovino un cuadro clínico y unas lesiones histopatológicas similares a las descritas en los casos de infección natural con el SGEV en ganado caprino, y son indistinguibles a las descritas en casos de infecciones naturales o experimentales con el virus Louping ill (LI) en el Reino Unido.

En el caso particular del síndrome neurológico observado en cabras del occidente de Nicaragua, caracterizado por ataxia, temblores y nistagmos se planteó la siguiente pregunta: ¿La alteración que presentan las cabras de Nicaragua es un proceso infeccioso relacionado con el LI o por el contrario se trata de una patología de etiología diferente?, esta pregunta se responde con los resultados publicados en un tercer artículo denominado “*Neurological syndrome in goats associated with Ipomoea trifida and Ipomoea carnea containing calystegines*”. El estudio histológico de las lesiones determinó que se trataba

de una enfermedad por almacenamiento de glucoproteínas relacionado con el consumo de plantas del género *Ipomoea* en concreto. *I. trifida* e *I. carnea*. La particularidad de este proceso en este caso fue que la swansonina, un alcaloide habitual en esta especie no se encontró en las plantas estudiadas, pero si se pudo determinar la presencia del alcaloide calisteína y que éste por sí solo fue el responsable del proceso.

Esta tesis pone de manifiesto la necesidad constante de estudiar y profundizar en la comprensión clínica, patológica y epidemiológica de las enfermedades emergentes y reemergentes a consecuencia de diferentes factores como el cambio climático y el comercio mundial.

IV. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

1.1. Las unidades estructurales del sistema nervioso y su función

El componente funcional primario del SNC es la neurona y las células de soporte constituidas por las células de la glía, las células que constituyen las meninges y los vasos sanguíneos. Las células de la glía (macroglía, astrocitos, oligodendrocitos y epéndimo), actúan como sistemas de sostén de las neuronas y sus extensiones celulares, desempeñando un papel fundamental en una amplia gama de funciones normales y reacciones frente a la lesión como la inflamación, la reparación, el equilibrio hídrico y el metabolismo energético (Kumar et al, 2005; de Lahunta & Glass 2009).

Las neuronas presentan reacciones básicas frente a la lesión, que desde el punto de vista histopatológico se corresponden con la degeneración neuronal y la muerte celular, así como las asociadas al proceso de reparación. Las lesiones agudas ocasionadas en neuronas por la hipoxia/isquemia, las infecciones o agentes tóxicos en el SNC (que conducen a la muerte de la célula), se caracterizan por una disminución del tamaño celular, picnosis, pérdida de la sustancia de Nissl y eosinofilia intensa del citoplasma (Kumar et al, 2005; de Lahunta & Glass, 2009).

La degeneración neuronal representa una serie de situaciones que se producen en procesos patológicos progresivos de larga duración. La alteración histopatológica característica es la pérdida selectiva de neuronas relacionadas funcionalmente y la gliosis reactiva. Por ejemplo, en las neuronas pueden aparecer inclusiones intracelulares producto del envejecimiento, por trastornos del metabolismo o por algunas enfermedades virales. En estos casos el cuerpo neuronal aumenta de tamaño progresivamente hasta causar la muerte de la célula (Summers et al, 1995; Kumar et al, 2005).

Los astrocitos son las células responsables de la reparación y formación de cicatrices en el cerebro, y su alteración patológica se puede ver limitada a las respuestas reactivas que acompañan a la proliferación celular (gliosis) y al conjunto de reacciones frente a la lesión que dan lugar a la degeneración o muerte celular. Los astrocitos se consideran las células intersticiales del SNC, que responden a la lesión mediante una hipertrofia e hiperplasia donde la gliosis es el indicador histopatológico más importante (Kumar et al, 2005). Se clasifican en dos tipos: el protoplasmático (tipo 1), localizado principalmente

dentro de la sustancia gris cerebral, y el fibroso (tipo 2), ubicado principalmente dentro de los tractos de sustancia blanca (Jubb & Palmer's, 2015).

Los astrocitos juegan un papel esencial en el movimiento de cationes y agua; son una fuente importante de citoquinas y factores de crecimiento involucrados en el mantenimiento de condiciones favorables para la actividad eléctrica de las neuronas. Los astrocitos tipo 2 juegan un papel importante en la desintoxicación de amoníaco, y otros metabolitos, y cuando sufren una lesión letal, el citoplasma se hincha y se vuelve eosinofílico, con el núcleo excéntrico y picnótico, adquieren dos o más núcleos y algunas células se rompen (Jubb & Palmer's, 2015).

Las células de la microglia (derivadas del linaje de fagocitos mononucleares) funcionan como el sistema de macrófagos fijos del SNC. En el cerebro y médula espinal sanos estas células se agrupan en la proximidad de las neuronas normales de la sustancia gris y de los vasos sanguíneos adyacentes. Las células de la microglia son las principales mediadoras de la respuesta inmune del SNC, que una vez activadas en el sitio de lesión expresan altos niveles de antígeno de histocompatibilidad, y como otros macrófagos liberan citoquinas amplificando la respuesta inflamatoria y reclutando así otras células al lugar de la lesión (Jubb & Palmer's, 2015).

1.2. Signos neurológicos según la localización de la lesión en el SNC

Una lesión general del cerebro provoca convulsiones, cambios en el comportamiento, alteraciones del estado mental y movimientos en círculos. Las lesiones localizadas pueden desatar déficits posturales, visuales y hemiparesia (tabla 1). En el tronco encefálico las lesiones desencadenan disfunción motora, hemiparesia, tetraparesia asimétrica y déficits posturales; también se observan alteraciones del estado mental y variaciones funcionales en los pares craneales. Las lesiones en cerebelo provocan temblores, hipermetría, ataxia y déficits del reflejo de amenaza. Cuando hay lesiones en el sistema vestibular se manifiestan alteraciones como ladeo de cabeza, ataxia, nistagmos posicionales, alteraciones del estado mental y déficits posturales (Pugh, 2002).

Las alteraciones de la médula espinal (mielopatías) pueden ser focales o multifocales. También pueden clasificarse como extrínsecas en aquellos casos en los que la disfunción medular es secundaria a un proceso que afecta primero a las vértebras o estructuras

subyacentes, e intrínsecas cuando el proceso primario afecta directamente a la médula espinal. Los signos clínicos secundarios a la mielopatía varían en función de la región medular afectada. Una disfunción medular puede provocar pérdida de la función motora voluntaria, alteraciones de reflejos espinales, cambios de tono muscular, atrofas musculares, disfunciones sensitivas y alteraciones vegetativas en vejiga y ano (Pugh, 2002).

Tabla 1. Signos neurológicos según la localización de la lesión en el sistema nervioso central (Pugh, 2002; Radostits et al, 2002)

Localización de la lesión	Estado mental	Ocular	Conciencia Propiocepción	Marcha	Postura
Corteza cerebral	Cambios del comportamiento	Visión normal	Déficits	Convulsión y ambulación en círculos	Ataxia
Lóbulo frontal	----	Respuesta palpebral normal	----	----	----
Lóbulo temporal	Alteración del comportamiento	----	----	Convulsión psicomotora	----
Diencefalo	----	----	----	Normal, pero puede ocurrir hemiparesia y tetraparesia	Normal
Tálamo Núcleo geniculado lateral	----	Desviación ocular hacia el lado de la lesión	----	----	----
Sistema límbico	Cambios de comportamiento	----	----	Convulsiones	----
Sistema reticular	Depresión, coma, convulsiones	----	----	----	----
Hipotálamo	Apetito anormal	----	----	----	----
Mesencefalo	Depresión, coma	Midriasis, estrabismo dorsomedial	Déficits	Espasticidad	Retraso en el giro a la normalidad
Metencefalo	Depresión, coma	Reflejo corneal presente	Déficits	Ataxia, hemiparesia y tetraparesia	Rigidez
Mielencefalo	Depresión severa y coma	Estrabismo medial, inhabilidad de retraer el ojo	Déficits	Ataxia, hemiparesia ipsilateral, tetraparesia	Déficits ipsilaterales al lado de la lesión
Cerebelo	Normal	Normal	Déficits en el reflejo de amenaza	Ataxia, hipermetría Opistótonos	Tremor

2. CAUSAS DE LESIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO (SN) EN RUMIANTES Y OTROS ANIMALES

Las alteraciones del SN en diferentes especies pueden aparecer por muchas situaciones como: traumatismos, neoplasias, alteraciones congénitas, alteraciones metabólicas, deficiencias nutricionales, procesos inmunomediados, degeneraciones, procesos infecciosos o parasitarios, e intoxicaciones por compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos, metales, y plantas (Pugh, 2002).

2.1. Traumatismos

Los traumatismos son una de las causas más frecuentes en la patología neurológica. Los principales signos clínicos (pérdida del estado mental, déficit visual y de postura) por lesiones localizadas se producen de forma inmediata (aguda) y cuando la lesión es difusa pueden cursar con convulsiones postraumáticas que aparecen semanas o meses después de la lesión (Pugh, 2002).

2.2. Neoplasias

Las neoplasias, que pueden ser tanto primarias como secundarias, suelen aparecer en cualquier área del territorio encefálico con los signos propios de la zona afectada, con un comienzo gradual y de progresión lenta. Uno de los signos más comunes es la alteración del estado mental (depresión, estupor o coma) y posteriormente, se pueden presentar convulsiones (Pugh, 2002).

2.3. Enfermedades metabólicas y nutricionales

Las enfermedades metabólicas y nutricionales suelen cursar con una alteración del SN conocida como poliencfalomalacia o necrosis cerebrocortical y afectan principalmente a los rumiantes jóvenes.

2.3.1. Poliencfalomalacia

La poliencfalomalacia (PEM) causa necrosis de la sustancia gris del cerebro y se asocia a la deficiencia de tiamina o a la destrucción de tiamina por tiaminasas presentes en gran variedad de plantas. Se ha documentado en bovinos, ovejas, cabras, ciervos y camélidos como camellos. Otras causas de PEM son ciertos derivados de la acidosis ruminal como los compuestos de sulfuros (H_2S , HSO_3) que son metabolizados por las

bacterias del rumen, la administración de amprolio y el exceso de sal en la dieta. Las lesiones asociadas a PEM incluyen hernia del cerebelo por el agujero magno, edema y reblandecimiento del cerebro. La sustancia gris adquiere un color marrón amarillento o se decolora. También pueden ocurrir hemorragias y formación de cavidades en la corteza cerebral. A través de la luz ultravioleta se puede visualizar una malacia cortical bilateral. Microscópicamente en las zonas afectadas se puede observar atrofia de neuronas o incluso ausencia de éstas (Colorado State University, 2017).

2.3.2. Ataxia enzoótica

La ataxia enzoótica es otro tipo de poliencefalomalacia, que consiste en una paresia progresiva debido a una degeneración neuronal y desmielinización secundaria en el SNC asociada a la deficiencia de cobre en cabras jóvenes. Estas lesiones son más evidentes en pedúnculos cerebelosos y puente (Jubb & Palmer's, 2015).

2.4. Alteraciones congénitas

Existe una gran variedad de malformaciones del SNC de origen congénito que son comunes en los animales domésticos. Generalmente requieren de un diagnóstico a través de la necropsia y es muy importante tener confirmación de la morfología. Las alteraciones nerviosas dependerán de la malformación y la zona afectada y muchas de ellas son incompatibles con la vida (tabla 2) (Jubb & Palmer's, 2015). Estas anomalías congénitas del SNC consisten en desviaciones en la naturaleza o velocidad del proceso de desarrollo. Una explicación es que el alto grado de diferenciación y complejidad del SNC predispone a una mayor susceptibilidad a las alteraciones del desarrollo. Además de las enfermedades hereditarias, una gran cantidad de enfermedades infecciosas y agentes ambientales tóxicos son capaces de causar anomalías.

El modo de acción más común para los teratógenos es la destrucción selectiva de células. Tales efectos citolíticos han sido demostrados en neuronas con defectos inducidos por virus, productos químicos, así como por agentes físicos. En el caso de los virus, aunque la destrucción celular puede ser una consecuencia directa de la infección, también puede ser parte de la reacción inflamatoria. En muchas drogas la toxicidad está mediada por metabolitos altamente reactivos (no por los compuestos en sí) que, si no son eliminados de manera correcta, estos metabolitos inestables interactuarán con macromoléculas celulares pudiendo llegar a destruir las células (Jubb & Palmer's, 2015).

Tabla 2. Malformaciones del desarrollo en sistema nervioso y su agente causal en cabras y otros animales domésticos (Iowa State University, 2009; Hyttel et al, 2010)

Alteración	Agente causal	Especie afectada
Hidrocefalia y quistes cerebrales	Virus de la lengua azul <i>Orbivirus</i> .	Variedad de rumiantes domésticos y salvajes
Alteraciones del desarrollo embrionario y fetal como retardo en el crecimiento óseo y displasia cerebelar	Enfermedad de Border <i>Pestivirus</i> Familia Flaviviridae	Ovejas, cabras y bovinos
Hipoplasia cerebelar, hidrocefalia, atrofia irregular y agenesia de la corteza cerebral acompañada de cavitaciones quísticas, desmielinización	Diarrea Viral Bovina <i>Pestivirus</i> , familia flaviviridae	Rumiantes
Hidranencefalia, agenesia cerebral, microencefalia, porencefalia o cavitación cerebelar. Generalmente, el tronco cerebral no presenta lesiones de importancia	Virus Akabane Schmallenberg <i>Orthobunyavirus</i>	Bovinos, ovinos, cabras y rumiantes salvajes
Hidranencefalia, prosencefalia y artrogriposis	Virus Wesselsbron <i>Flavivirus</i>	Cabras, ovejas y bovinos
Hidrocefalia, hipoplasia cerebelosa y de médula espinal. Artrogriposis	Fiebre del Valle de Rift Phlebovirus (Bunyavidridae)	Variedad de rumiantes y otras especies animales
Dismetría, ataxia. Degeneración cerebelar difusa y pérdida de células de Purkinje	Abiotrofia cerebelosa. Almacenamiento lisosomal debido a defectos genéticos de proteínas	Bovinos, ovinos, cabras y otros animales domésticos

2.4.1. Degeneraciones (abiotrofias) en cabras

Las degeneraciones son un grupo de enfermedades neurológicas caracterizadas por degeneración postnatal prematura de las neuronas cerebelosas, secundaria a defectos en una variedad de genes responsables del metabolismo celular y homeostasis (Summers et al, 1995). Estos procesos degenerativos también se deben al deterioro intrínseco del metabolismo celular por falta de suministro de sangre (isquemia), exposición a sustancias exógenas, toxinas y anomalías sistémicas (uremia, trastornos hepáticos y cardiorrespiratorios). Las degeneraciones generalmente encierran signos clínicos de disfunción y lesiones cerebelosas (de Lahunta & Glass, 2009).

Estos procesos se han descrito en muchas especies domésticas, pero no siempre están asociados a la herencia de genes recesivos. Existen descripciones de procesos clínicamente similares a ataxia cerebelosa secundaria a la ingestión de plantas neurotóxicas en rumiantes, incluyendo cabras. Los signos clínicos que presentan los animales con ataxia cerebelosa son variables y progresivos, que se pueden iniciar en la etapa postnatal, o en la edad adulta (Koehler et al, 2015).

Las lesiones descritas con frecuencia en los animales domésticos consisten en degeneración de la corteza cerebelosa que se relacionan con el tipo de célula primaria afectada y el defecto genético específico. Los cambios histopatológicos consisten en degeneración y pérdida de las células de Purkinje con degeneración secundaria y pérdida de células de la capa granular, adelgazamiento de la capa molecular, y proliferación de astrocitos y células de Bergman (Summers et al, 1995; de Lahunta & Glass, 2009).

Koehler et al (2015) reportaron un caso de abiotrofia cerebelar en un grupo de cabras genéticamente emparentadas. Los signos clínicos en este grupo de animales iniciaron aproximadamente a los dos meses de edad y consistían en cabeza oscilante, temblores, ataxia y nistagmos rotatorios que empeoraban cada vez que se les estimulaba. En estos casos no se conocía de exposición a plantas o toxinas neurotóxicas. Los parámetros hematológicos y bioquímicos estaban dentro de los valores normales y los análisis contra el virus de artritis encefalitis caprina (CAE) fueron negativos.

En el examen macroscópico el volumen del cerebelo se observó levemente reducido, con un estrechamiento notable de ancho del vermis y estrechamiento afilado leve de los pliegues foliares sobre el vermis y áreas periféricas. Microscópicamente, las áreas afectadas tenían una marcada hipocelularidad de la capa granular interna y marcada pérdida de las células de Purkinje. La sustancia blanca presentaba eosinofilia y ocasionalmente pequeñas vacuolas. Se realizó inmunohistoquímica (IHC) para la detección de la proteína glial ácida fibrilar (GFAP) donde se pudo apreciar áreas de mayor proliferación de células de Bergman y pérdida de células de Purkinje en corteza cerebelar (Koehler et al, 2015).

2.4.2. Enfermedades por almacenamiento lisosomal en cabras y ovejas

Se han descrito muchas variantes de estas enfermedades en cabras, clasificándose según el grado de sintomatología clínica que presenten, pudiendo ser de comienzo temprano o tardío según el defecto molecular presente (tabla 3). La edad y el espectro de signos clínicos exhibidos varían en dependencia de la función de la proteína afectada, la bioquímica de la sustancia almacenada y el tipo de célula donde ocurre el almacenamiento (Walkley & Jolly, 1997; Pugh, 2002; Platt et al, 2012).

Este grupo de enfermedades puede considerarse como un proceso patológico primario dentro de la célula, donde ocurre el depósito de una sustancia con potencial perturbador de la función catabólica implicada. La mayoría de estas enfermedades se caracterizan por depósitos de sustancias en los lisosomas por lo que se denominan “enfermedades por almacenamiento lisosomal”. Todas las células son potencialmente vulnerables a estos procesos, aunque son más susceptibles las células de larga vida como las neuronas y los miocitos cardíacos. Cuando la enfermedad afecta a neuronas y se sobrepasa la capacidad fisiológica de digestión, eliminación o transporte celular el resultado clínico son alteraciones neurológicas (Jubb & Palmer's, 2015).

La actividad lisosomal se puede alterar por diferentes razones, siendo la más relevante una deficiencia de la hidrolasa lisosomal específica debido a un defecto genético, base de este tipo de enfermedades (hereditarias) en humanos y animales, transmitidas por genes autosómicos recesivos. Otras razones pueden ser una deficiencia en la actividad enzimática por ausencia total de la proteína enzimática, por producción de una enzima defectuosa o inestable, o por ausencia de la proteína activadora específica requerida por algunas enzimas para el inicio de la actividad catabólica.

Cuando el proceso es hereditario, éste comienza en la gestación y, en muchos casos, en el momento del nacimiento ya está bien desarrollado, aunque el deterioro clínico puede ser leve en ese momento. La edad de inicio y la velocidad de progresión de la enfermedad pueden variar, probablemente en función de la actividad enzimática residual (Jubb & Palmer's, 2015).

Ciertos mecanismos alternativos exógenos, como toxinas vegetales, pueden inducir al almacenamiento lisosomal, a la inhibición específica de una enzima lisosomal y a la inducción temporal de un estado análogo a la deficiencia genética de la enzima. Este es el mecanismo establecido en intoxicaciones como el "locoísmo" causado por plantas del género *Astragalus* y *Oxitropis* (ver apartado 2.7). Otro mecanismo puede ser que, un sustrato exógeno, resistente a la batería enzimática normal y estable a las vías degradativas, induzca la enfermedad por almacenamiento mediante la formación de complejos con moléculas endógenas que resultan en productos no digeribles (por ejemplo, la cloroquina) (Jubb & Palmer's, 2015).

La característica histológica de estas enfermedades es la presencia de neuronas distendidas y llenas de vacuolas que contienen el material almacenado. Estas vacuolas representan la capacidad adaptativa del aparato lisosomal y, en la mayoría de los casos, la morfología y la reactividad histoquímica de la sustancia almacenada puede indicar claramente su naturaleza, por ejemplo, el glucógeno (Platt et al, 2012; Jubb & Palmer's, 2015).

Ante un proceso de almacenamiento progresivo, las neuronas no tienen más remedio que acumular vacuolas hasta que ellas, o el animal, mueran. Existe una capacidad limitada para descargar parte de la sustancia almacenada por exocitosis pero, en general, esto es complicado cuando la actividad enzimática es deficiente. A pesar de esto, la célula limita los sitios de almacenamiento al soma y a los tallos dendríticos más grandes. Como resultado, el soma se distiende mucho y el contorno de la célula se redondea y se hincha. Sin embargo, aún dentro del soma, el almacenamiento puede estar polarizado, a menudo adyacente, o con desplazamiento de las vacuolas a otros orgánulos, adquiriendo la neurona un aspecto cromatolítico y espumoso. Generalmente las células gliales y endoteliales se ven afectadas de manera similar (Jubb & Palmer's, 2015).

En varias enfermedades de almacenamiento ciertas poblaciones de neuronas, particularmente las neuronas del sistema piramidal de la corteza cerebral y de los núcleos de transmisión talámicos, sufren una forma de hipertrofia focal para generar más "espacio de almacenamiento". Estos cambios, por fatales que sean, no pueden apreciarse sin el uso de técnicas especiales. Además, se pueden desarrollar depósitos focales a lo largo de los axones, que aparecen como cuerpos esferoides eosinofílicos, a menudo muy prominentes en algunos grupos nucleares, exhibiendo una tendencia a formarse en las regiones presinápticas terminales de los axones, aunque pueden verse en cualquier parte de la sustancia blanca o de los nervios periféricos. Estos esferoides no contienen material de almacenamiento específico, pero están llenos de orgánulos degenerados o túbulos y vesículas anormales. El significado funcional de esta distrofia axonal secundaria no está claro, pero es una característica patológica prominente en muchas enfermedades de almacenamiento (Platt et al, 2012; Jubb & Palmer's, 2015).

Tabla 3. Fenotipos clínicos de enfermedades hereditarias en cabras que causan almacenamiento lisosomal (Walkley & Jolly, 1997; Pugh, 2002; Platt et al, 2012)

Enfermedad	Proteína lisosomal defectuosa	Sustrato almacenado	Órganos y sistemas afectados	Razas afectadas	Patología en SNC	Signos clínicos	Diagnóstico
Manosidosis (Glicoproteinosis)	α - Manosidasa β -Manosidasa	Carbohidratos, lípidos, proteínas.	Esqueleto corazón	Nubia (y sus cruces)	Positivo	Incapacidad de levantarse. Contracción del carpo. Extensión de extremidades traseras. Hiperextensión del paso. Temblor intencional. Nistagmos, sordera. Síndrome de Horner bilateral	Niveles reducidos en plasma de α o β -manosidasa. Oligosacáridos anormales en orina. Histopatología: Vacuolización de neuronas y otras células. Desmielinización
Gangliosidosis generalizada (GM ₁)	β -Galactosidasa	GM1-gangliosido, oligosacáridos	Esqueleto, corazón	Suffolk	Positivo	Son normales al nacer, presentan ataxia a partir de los 4 a 6 meses y postración a las dos semanas siguientes	Por histopatología se observa vacuolización, marcada distensión del citoplasma de neuronas, hepatocitos periportales, células epiteliales y renales
Enfermedad de Krabbe (Leucodistrofia de células globoides, Galactocerebrosidosis)	Galactocerebrosidasa (GALC) Deficiencia de β -galactosidasa	Galactocilceramida	Corazón	Polled Dorset	Positivo	Incoordinación de los miembros pélvicos progresando a tetraplejía destructiva	Disminución de la actividad de galactocerebrosidasa del cerebro Por histopatología: pérdida de la oligodendroglía, astrogliosis. Acumulación de PAS positivo en células globoides

2.5. Enfermedades que desencadenan reacciones inflamatorias específicas del SNC

Las enfermedades que desencadenan reacciones inflamatorias implican un proceso patológico y una serie de mecanismos vasculares, físicos, químicos y biológicos en el tejido nervioso (tablas 4 y 5). En dependencia de la causa, aparecen abundantes leucocitos y reacciones vasculares que predisponen a la aparición de exudados y de signos clínicos de tipo encefálico o meníngeo (Jubb & Palmer's, 2015). Los procesos víricos y protozoarios presentan un cuadro encefálico con signos muy variables como paresia, parálisis, alteraciones del estado mental y convulsiones, que dependen de la localización y extensión de la inflamación. Las inflamaciones supurativas (bacterianas) se caracterizan por una reacción neutrofílica como respuesta a la necrosis. Las reacciones inflamatorias no supurativas se caracterizan por una respuesta linfocítica o monocítica usualmente desencadenadas por procesos virales o anormalidades del sistema inmune (Jubb & Palmer's, 2015).

2.5.1. Reacción del SN frente a las infecciones

El organismo se defiende contra la invasión de agentes patógenos mediante la inmunidad innata o adaptativa, y aunque los agentes nocivos y los procesos inflamatorios que afectan al SNC son básicamente los mismos que en otros tejidos la defensa del mismo depende de la capacidad innata para reconocer y eliminar estos agentes, que junto a sus disposiciones anatómicas se diferencia de los órganos parenquimatosos por algunas características específicas de respuesta especial (Jubb & Palmer's, 2015).

La inmunidad innata del cerebro está compuesta de células dendríticas perivasculares, microglía y astrocitos (células residentes). Estas células son ricas en receptores que reconocen patrones que se unen de forma directa y no específica a moléculas asociadas a patógenos como los receptores de manosa de macrófagos, que son receptores de lecitina que reconocen azúcares "no propios" en la pared celular de bacterias, parásitos y levaduras (Jubb & Palmer's, 2015).

El reconocimiento de patógenos por parte de las células microgliales y astrocitos también depende de receptores de membrana importantes para la fagocitosis como el CR3 y el CR4. Las células gliales también liberan citoquinas y péptidos antimicrobianos como la

interleuquina-1, factor de necrosis tumoral o el péptido antimicrobiano catelicidina. Una vez que un agente infeccioso ha superado la inmunidad innata residente la respuesta inflamatoria del cerebro comienza con el reclutamiento de diferentes componentes de la inmunidad adaptativa (leucocitos) e inmunidad humoral (Jubb & Palmer's, 2015).

Otros mecanismos protectores del SNC lo constituyen las unidades estructurales que separan las células cerebrales de la corriente sanguínea como la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera del fluido sanguíneo cerebrospinal (LCR). Las células endoteliales de la BHE difieren de otras células endoteliales del cuerpo por tener significativamente menos vesículas endocitóticas, lo que limita la cantidad de flujo transcelular, y por las conexiones con proteínas adherentes (ej., cadherina), que reducen significativamente el flujo paracelular. Además, las células endoteliales de la BHE son ricas en sistemas de transporte selectivos de nutrientes esenciales para el cerebro o de material nocivo que regresa a la sangre (proteínas de transporte de eflujo como la P-glucoproteína que inhibe la invasión tisular de *Listeria monocytogenes*. Otra propiedad protectora de la BHE es la presencia de uniones “estrechas” en el LCR lo que restringe el paso de agentes o sustancias nocivas hacia el SNC (Jubb & Palmer's, 2015).

EL neurotropismo de los organismos patógenos se determina por la capacidad para romper estas barreras, como los virus y bacterias neurotrópicos que han desarrollado mecanismos para romper o cruzar estas barreras, por ejemplo, el virus de la rabia invade el cerebro a través de axones; las bacterias como *Mycobacterium bovis* invaden el cerebro como caballos de Troya ocultos en leucocitos infectados e *Histophilus somni* tiene efecto citotóxico directo sobre las células endoteliales de la BHE (Jubb & Palmer's, 2015).

2.5.2. Procesos inflamatorios causados por virus, priones, bacterias y parásitos en el SN de cabras y otros animales

Tabla 4. Enfermedades causadas por priones y virus que desencadenan inflamación en sistema nervioso central de cabras (Pugh, 2002; Jubb & Palmer's, 2015)		
Patología y agente causal	Alteraciones nerviosas	Lesiones en Sistema Nervioso
Scrapie (Proteína prión)	Alteraciones de comportamiento y de la sensibilidad, incoordinación progresiva de movimientos en el tercio posterior, convulsiones musculares, hiperestesia y prurito. Se presentan temblores coordinados de la cabeza y cuello, excitabilidad y convulsiones epileptiformes.	Vacuolización neuronal y del neuropilo, así como, pérdida de neuronas en núcleos específicos del bulbo raquídeo y puente. No se aprecia reacción inflamatoria. Se debe especificar las lesiones
Rabia (<i>Lisavirus</i>)	Curso clínico agudo caracterizado por cambios de comportamiento (euforia) o parálisis.	Meningoencefalitis no purulenta difusa y ganglioneuritis. Manguitos perivasculares o infiltración linfocítica perivascular. Lesiones difusas que a menudo se encuentran en células de Purkinje en cerebelo de rumiantes. El virus afecta con frecuencia el tallo encefálico, hipocampo, médula espinal y ganglios, especialmente el trigémino. Cuerpos de inclusión intranucleares en neuronas corticales, del hipocampo y células de Purkinje.
Aujeszky (<i>Herpesvirus</i>)	Vocalizaciones, prurito en áreas localizadas, automutilación por el rascado o lamido, ataxia, parálisis.	Encefalitis no supurativa caracterizada por manguitos perivasculares, gliosis focal neuronofagia y satellitosis. Necrosis de la sustancia gris y la presencia de cuerpos de inclusión eosinofílicos en neuronas y astrogliá.
Virus Louping ill (Arbovirus)	Pueden incluir temblores musculares y/o rigidez, falta de coordinación, ataxia, hipersensibilidad, salivación y mordisqueo nervioso, evolucionando en algunos casos a presión de cabeza contra objetos, parálisis posterior, decúbito y/o coma.	Poliencefalomielitis, leptomeningitis. Microscópicamente hay degeneración neuronal y neuronofagia.
Artritis encefalitis caprina. (Lentivirus)	Disfunción motora espinal y signos de enfermedad cerebral.	Encefalomielitis con infiltración perivascular por células mononucleares. Mastitis, artritis y neumonía intersticial.
Maedi/visna (Lentivirus)	Caracterizada por cuatro síndromes clínicos y patológicos: mastitis, artritis, neumonía intersticial y forma nerviosa.	Desmielinización crónica con meningitis mononuclear con presencia de manguitos perivasculares formados por linfocitos y macrófagos. Gliosis y malacia.
Virus Akabane (Bunyavirus)	Temblores, ataxia, parálisis, nistagmos, opistótono e hipersensibilidad.	Malformaciones del SNC. Encefalomielitis linfohistiocitaria no supurativa; estas lesiones son más frecuentes en el puente, tronco encefálico y médula oblonga y la materia gris de las astas ventrales de la médula espinal.

Tabla 5. Enfermedades causadas por bacterias y parásitos que causan inflamación del sistema nervioso central en cabras y otros animales (Pugh, 2002; Jubb & Palmer's, 2015)

Patología y agente causal	Alteración nerviosa	Lesiones en Sistema Nervioso
Encefalitis exudativa		
<i>Streptococcus, Staphylococcus, Brucella, Pasteurella, Bacteroides, Fusobacterium, Actinobacillus y Streptococcus</i>	Los signos clínicos varían de acuerdo con el área afectada, pudiendo ser desde dolor leve e inquietud hasta ceguera y ataxia.	Leptomeningitis, meningoencefalitis. Lesiones sépticas, abscesos granulomatosos y piogranulomatosos.
Listeriosis (<i>Listeria monocitogenes</i>)	Signos clínicos variables en dependencia de la severidad de la infección. Los animales afectados pueden presentar confusión y depresión mental, desviación de la cabeza, parálisis o movimientos en círculos y parálisis de los músculos masticatorios y la faringe.	Encefalomiелitis purulenta multifocal formada por microabscesos que puede ser unilateral o de mayor intensidad en uno de los hemisferios.
Encefalitis granulomatosa		
Toxoplasmosis (<i>Toxoplasma gondii</i>)	Falta de coordinación, debilidad, incapacidad para mamar, y alto índice de mortalidad.	Focos de necrosis, en ocasiones rodeada por células mononucleares y presencia de quistes del parásito. Puede presentarse hemorragias, edemas y dilatación ventricular.
Cenurosis (<i>Taenia multiceps</i>)	Fiebre transitoria, apatía y signos leves neurológicos como comportamiento anormal, marcha en círculos, ataxia, hipermetría, ceguera, desviación de la cabeza, parálisis, convulsiones, hiperexcitabilidad, así como postración y emaciación	Meningoencefalitis focal con formación de trayectos y destrucción de tejidos, hemorrágicas, necrosis, leucocitosis y fenómenos de reparación debidas a la migración de larvas. Atrofia por presión y obstrucción del flujo del LCR por el crecimiento de la vesícula.

2.6. Louping ill (LI)

La enfermedad LI, también conocida como encefalomiелitis infecciosa ovina (EIO) se ha descrito en ovejas de Escocia desde el siglo XVIII y su transmisión se ha asociado a garrapatas desde hace más de 100 años (Jeffries et al, 2014). Es una enfermedad viral aguda que se caracteriza por fiebre bifásica, depresión, ataxia, incoordinación muscular, temblores, parálisis de la parte posterior del cuerpo, coma y muerte. Su ocurrencia está estrechamente relacionada con la distribución del vector primario, la garrapata *Ixodes ricinus*. Los signos clínicos graves se pueden observar en los rebaños de ovejas susceptibles trasladadas a zonas endémicas. Muchos animales pueden desarrollar la enfermedad neurológica y puede causar la muerte de hasta el 60% de los animales. La mayoría de las pérdidas se producen entre las ovejas más jóvenes no vacunadas que no están protegidas por los anticuerpos maternos (Murphy et al, 1999; Iowa State University, 2009).

El LI es endémico en tierras altas de Gran Bretaña e Irlanda. Actualmente, en el siglo XXI es una enfermedad olvidada, que se ha mantenido sin cambios en los últimos 80 años, con vacilante producción de vacunas, pruebas serológicas que se han utilizado con éxito y pruebas moleculares que muy poco a poco se están desarrollando para mejorar la detección del virus (Davidson et al, 1991; Jeffries et al, 2014). La decadente rentabilidad de la cría de ovejas ha contribuido a este abandono, y las repetidas incursiones de enfermedades infecciosas emergentes/reemergentes como la fiebre aftosa, lengua azul y virus de Schmallenberg han llamado la atención de estas enfermedades exóticas en lugar de las infecciones endémicas localizadas y persistentes. Se debe considerar y reconocer las consecuencias de las enfermedades exóticas transmitidas por artrópodos, lo que hace oportuno recordar que la reaparición del LIV es evidente, una enfermedad zoonótica transmitida por garrapatas que ha persistido a pesar de la vacunación y de una mejor comprensión de la epidemiología del virus y del control de sus vectores (Jeffries et al, 2014).

2.6.1. Etiología. Clasificación del virus

La enfermedad Louping Ill está producida por el virus Louping Ill (LIV), que fue el primer virus transmitido por artrópodos que logró aislarse en Europa (Selkirkshire, Escocia) en 1929 (Jeffries et al, 2014). Está agrupado dentro de la familia Flaviviridae, género *Flavivirus*, con un número creciente de subtipos del virus transmitido por garrapatas, y todos sus miembros presentan un genoma ARN de cadena simple en sentido positivo (Murphy et al, 1999; Iowa State University, 2009).

El genoma de LIV conserva la estructura genómica de la familia Flaviviridae, conformada por la cápside, la cual se divide en: pre-membrana (prM), envoltura (E) y genes no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS4, NS4A, NS4B, NS5) (figura 1). La envoltura proteínica comparte reacción cruzada antigénica con otros *Flavivirus* transmitidos por garrapatas lo que la convierte en el objetivo principal de anticuerpos neutralizantes (figura 1). El virus es sensible al calor, a los desinfectantes y al pH ácido (Gritsun et al, 2003; Jeffries et al, 2014).

La comparación de la secuencia genómica a través de análisis filogenético ha confirmado que el virus pertenece a un subgrupo de virus antigénicamente relacionados conocidos como los virus de las encefalitis transmitidas por garrapatas; cuyos miembros incluyen el complejo de virus de la encefalitis transmitida por garrapatas de Europa (TBEV), el virus de la fiebre hemorrágica de Rusia, el virus de la enfermedad de la selva de Kyasanur de India, el virus Langat de Malasia, el virus Negishi de Japón, y el virus Powassan de Norte América (Stephenson et al, 1984; Murphy et al, 1999; Jeffries et al, 2014). Aunque no hay evidencia de variación significativa en la patogenicidad entre cepas de LIV de una variedad de especies de vertebrados y de garrapatas, algunos estudios revelan heterogeneidad antigénica entre éstas (Davidson et al, 1991; Hubalek et al, 1995; Marín et al, 1995; Marston et al, 2013).

Se han identificado cuatro subtipos de virus de la enfermedad LI, subtipo británico, irlandés, español y turco; sin embargo, un reciente análisis genético sugiere que el subtipo del virus de la encefalitis de las ovejas de Turquía está estrechamente relacionado con el virus de la enfermedad TBEV y debe ser reclasificado (Iowa State University, 2009).

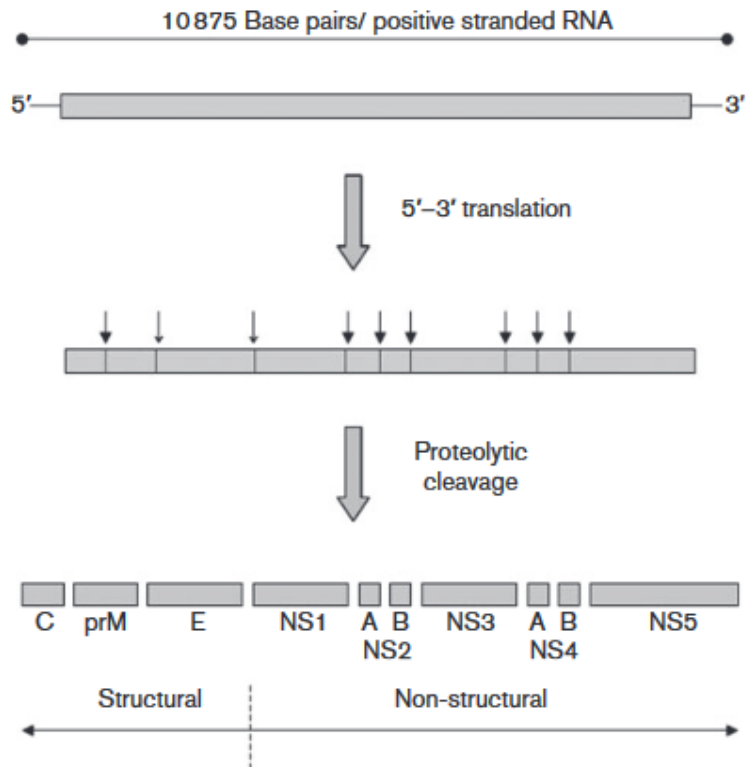


Figura 1. Esquema del genoma de LIV donde se muestra la traslación de la poliproteína viral y la segmentación proteolítica para generar proteínas individuales. Las puntas de flecha angostas indican la segmentación mediante una proteasa codificada viralmente, mientras que las puntas de flecha anchas son sitios de segmentación mediados por proteasas del huésped tales como la furina (Grard et al, 2007).

2.6.2. Epidemiología

Existen subtipos de TBEV que presentan una alta tasa de letalidad próxima al 40%. Por otro lado, existen una serie de virus de las enfermedades transmitidas por garrapatas, estrechamente relacionados, que causan enfermedad neurológica en ovejas o cabras que se han descrito como virus de encefalomiелitis ovina (Gao et al, 1993; Jeffries et al, 2014). Éstos incluyen el virus de la encefalitis de las ovejas turcas, el virus de la encefalitis de la cabra griega, el virus de la encefalitis de las ovejas españolas y el virus de la encefalitis de las cabras españolas (SGEV) (Marín et al, 1995; Balseiro et al, 2012). Ahí permanece cierto debate sobre la clasificación óptima de los diferentes aislados de LIV y los virus dentro del complejo de encefalitis transmitidas por garrapatas (Gao et al, 1993).

Los focos de LIV parecen estar geográficamente limitados, siendo a la vez una enfermedad poco frecuente. Sin embargo, TBEV es un fenómeno generalizado y en aumento en la incidencia y área de distribución geográfica (Grard et al, 2007; Jeffries et al, 2014).

El virus se excreta activamente en la leche de cabras y ovejas infectadas y esto representa una gran amenaza como mecanismo de transmisión para corderos, cabritos y el hombre al consumir leche procedente de animales enfermos. El virus no es resistente a las condiciones ambientales, se destruye fácilmente con los desinfectantes y la inmunidad adquirida por los animales que sobreviven a una infección por este virus persiste toda la vida. Algunas aves, cerdos, bovinos, equinos, roedores y animales silvestres pueden actuar como reservorios del virus (Blood et al, 1992).

El LI causa grandes mortandades en el urogallo rojo (*Logopus scoticus*), ave que juega un papel muy significativo en la epidemiología de la enfermedad actuando como reservorio temporal y amplificador del virus. El ciervo común, el alce y el corzo actúan como huéspedes alternativos y replicadores temporales del virus y pueden desarrollar la enfermedad clínica cuando son sometidos a estrés (Blood et al, 1992).

2.6.3. Distribución geográfica

Es difícil determinar la distribución geográfica del LIV debido a que está estrechamente relacionado con el TBEV, un virus común en Europa y que se encuentra en toda la latitud norte de clima templado (Blood et al, 1992; Iowa State University, 2009). La encefalomiелitis ovina se presenta en las Islas Británicas, principalmente a lo largo de las tierras altas de Escocia, Irlanda, norte de Inglaterra y Gales donde se encuentra la garrapata vector *Ixodes ricinus* (Davidson et al, 1991). El LIV tiene una estrecha relación con el virus causante de una enfermedad similar en Noruega, otro subtipo descrito y documentado en la región vasca de España y otros virus similares que aparecen por Europa continental (Fernández de Luco, 1991; Marín et al, 1995; Balseiro et al, 2012).

Basados en la filogenia molecular de la envoltura del LIV aislado en las Islas británicas se sugiere que hay cuatro linajes separados geográficamente, el genotipo 1 en Escocia e Inglaterra; el genotipo 2 en Escocia; el genotipo 3 en Gales y el genotipo 4 en Irlanda. Este análisis también sugiere que un aislado de LIV realizado en Noruega se originó en Gran Bretaña, y está agrupado con el genotipo 1 aislado de Escocia e Inglaterra (Gao et al, 1993; Jeffries et al, 2014).

Aunque no hay variación en las manifestaciones de la enfermedad en el ganado ovino, las muestras de LIV estudiadas tienen menos del 5% de divergencia en la secuencia de codificación genética, a lo que ha contribuido la separación geográfica por años. Por la divergencia entre los virus se considera que la enfermedad ha estado presente desde hace 300 años y que está íntimamente ligada al movimiento de animales de granja en las Islas Británicas (McGuire et al, 1998; Jeffries et al, 2014).

Estudios de genética molecular realizados a partir del aislamiento del SGEV en cabras españolas en 2011 sugieren que éste es idéntico en un 94% a las cepas LIV del Reino Unido que se han analizado, y es 93% idéntico al virus español de la encefalitis de las ovejas (Balseiro et al, 2012). En el estudio se compararon fragmentos del genoma del virus y se hizo una comparación adicional del genoma completo de éste y otras cepas de LIV. Estas características genómicas obligaron a la secuenciación completa de los virus en adición a la secuencia del genoma completo publicado en 1997, que fue aislado originalmente de una garrapata infectada (Marston et al, 2013).

La secuenciación de otra variante de LIV aislado directamente de la médula espinal de una oveja con signos neurológicos típicos de la enfermedad mostró un 95,6% de identidad con el genoma LIV original y un 97,5% en el nivel de aminoácidos (Marston et al, 2013). Esta información es importante en el establecimiento de la medida de variación de LIV, en el que se delimitan los miembros del género *Flavivirus* de las encefalitis transmitidas por garrapatas y en la comprensión de las causas subyacentes para las diferentes propiedades de virulencia dentro del grupo (Marston et al, 2013; Jeffries et al, 2014).

Tradicionalmente se piensa que los virus del complejo TBEV evolucionan porque son capaces de mutar. Sin embargo, estudios recientes sobre la posibilidad de recombinación han cuestionado esto, proponiéndose que una cepa de LIV es una recombinación con una inserción en el gen NS3 de una cepa de TBEV (Bertrand et al, 2012). Un nuevo estudio sugiere que este evento de recombinación probablemente haya ocurrido *in vitro* o durante ensayo *in vivo* después de su aislamiento, en lugar de ocurrir de forma natural (Norberg et al, 2013).

Se cree que la dispersión geográfica de estos virus en la naturaleza actúa como una barrera para la recombinación ya que esto requiere que los virus coexistan (Norberg et al, 2013). Los virus de este grupo tienden a estar separados geográficamente, aunque se ha informado de la detección de LIV y TBEV en garrapatas de las islas Bornholm en Dinamarca (Jensen et al, 2004). Esto plantea preguntas acerca de la posible evolución futura de este complejo de virus que se podría superponer en mayor medida a su distribución geográfica, lo que podría a su vez tener implicaciones en la virulencia, especificidad de especie y, por lo tanto, en el control del virus y en el desarrollo de vacunas (Norberg et al, 2013).

2.6.4. Transmisión

El vector natural de LIV es la garrapata *Ixodes ricinus*; y la oveja la especie de destino y reservorio más importante que puede actuar como huésped replicador por un corto período de tiempo, ya que pueden morir rápidamente tras la infección. Macleod y Gordon en 1932 demostraron la asociación entre la enfermedad LI y las garrapatas a través de la transmisión de la enfermedad por inoculación de macerados de *I. ricinus* en ovejas susceptibles (Jeffries et al, 2014). La mayor distribución de LIV se refleja en aquellas áreas donde las garrapatas son más abundantes, principalmente en zonas de tierras altas para pastoreo. Otras especies de garrapatas como *Rhipicephalus appendiculatus*, *Ixodes persulcatus* y *Anatolicum haemaphysalis* son capaces de transmitir LIV, pero no parecen ser importantes en la epidemiología de esta enfermedad por no ser vectores competentes donde el virus pueda replicarse. Sólo las ovejas y el urogallo rojo desarrollan constante y suficiente viremia para infectar a las garrapatas y replicar el virus (Blood et al, 1992; Iowa State University, 2009; Barrett et al, 2012).

La ocurrencia de LI en países endémicos se correlaciona estrechamente con la distribución de la garrapata vector, que requiere un medio ambiente con una humedad relativa alta. En las diferentes fases de alimentación del ciclo de vida de la garrapata *I. ricinus*, las larvas y ninfas necesitan alimentarse de sangre antes de la metamorfosis a la siguiente etapa; y las hembras apareadas requieren de sangre antes del desarrollo de los huevos y de que ocurra la ovoposición. Por lo tanto, todas las etapas de garrapatas, larva, ninfa y adulto pueden adquirir el virus al alimentarse de una gran cantidad de sangre durante la fase de viremia (Gray, 1991; Jeffries et al, 2014).

Una característica importante de la bionomía de *I. ricinus* que tiene gran impacto en la epidemiología de LI es la periodicidad anual en su ciclo de vida, que dura aproximadamente 3 años en completarse, aunque puede tomar más tiempo. La actividad pico de garrapatas se produce durante la llegada de la primavera, y este resurgimiento de actividad en algunas zonas ocurre durante el final de la primavera. Aunque los casos de LI pueden ocurrir en cualquier momento del año, la enfermedad es más frecuente durante los períodos de máxima actividad de la garrapata entre abril y junio (ascenso de la primavera) y de nuevo en septiembre, meses en los que *I. ricinus* se alimenta (Gray, 1991).

La alimentación está precedida por un comportamiento llamado “búsqueda”, donde la garrapata en sus diferentes estados de vida sube a las partes altas de la vegetación y se posa en sitios expuestos para entrar en contacto con las extremidades del huésped casual. El movimiento, el calor y el dióxido de carbono exhalado por un huésped potencial son atractivos para las garrapatas en búsqueda. En este momento, si las reservas de energía se agotan la garrapata morirá, pero los pequeños mamíferos, aves y reptiles resultan huéspedes adecuados para las etapas juveniles, y los grandes mamíferos, en particular ovejas y ciervos, son los preferidos por los estadios adultos. Las infestaciones por garrapatas de tales especies pueden ser altas, sin embargo, todavía no hay evidencia concluyente de que alguna especie específica sea vital para el mantenimiento del LIV en un área en particular (Gilbert et al, 2000; Randolph et al, 2002; Laurenson et al, 2003; Jeffries et al, 2014).

El LIV se replica activamente en la garrapata y puede sobrevivir a la transición entre las etapas, conocida como la transmisión transestadial, ya que no hay evidencia hasta la fecha de la transmisión transovárica del LIV (Hudson et al, 1995). Las garrapatas no infectadas pueden infectarse por coalimentarse en proximidades con garrapatas infectadas, hecho que se observó inicialmente en la transmisión de TBEV (Labuda et al, 1993). Un mecanismo similar se ha descrito para la transmisión de LIV en garrapatas *I. ricinus* que se alimentan de sangre de liebres de montaña (Jones et al, 1997; Jeffries et al, 2014).

El LIV también se puede transmitir por la leche de cabras, y en menor medida en la de ovejas, por lo que los corderos y cabritos pueden infectarse cuando están lactando. El urogallo rojo puede infectarse por alimentación con garrapatas, y los cerdos se enferman cuando ingieren subproductos y carne cruda de corderos infectados. La propagación iatrogénica puede ocurrir con las agujas o instrumentos quirúrgicos (Iowa State University, 2009).

El LIV también puede transmitirse a los humanos por picadura de garrapata o por la exposición al aerosol o material infeccioso a través de abrasiones o heridas de la piel. Es más frecuente la infección adquirida por la manipulación de animales infectados en los mataderos. La potencial transmisión oral del virus a los humanos también existe por el consumo de leche de cabras u ovejas que se encuentran en la fase aguda de la infección (Blood et al, 1992; Murphy et al, 1999; Iowa State University, 2009).

2.6.5. Periodo de incubación

El período de incubación de LIV varía de 6 a 8 días en condiciones de exposición natural. En ovejas infectadas experimentalmente por ciertas rutas no naturales de infección (inoculación intracerebral) este período se acorta. Después de la infección se produce la viremia concurrente con pirexia (Iowa State University, 2009). Si la entrada al tejido nervioso se efectúa a través de la BHE, se observa una reacción febril secundaria en el momento de la aparición de los signos nerviosos. Los animales donde no ocurre invasión del tejido nervioso se recuperan rápidamente y adquirirán inmunidad para las infecciones sucesivas, pudiendo persistir el virus en la sangre de estos animales por algún tiempo (Blood et al, 1992).

En animales de experimentación puede ocurrir invasión del SNC, aunque las lesiones suelen ser pequeñas y aisladas, asociándose el desarrollo de la enfermedad nerviosa con la replicación del virus en células nerviosas provocando la muerte del animal. En este mismo grupo de animales los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación se detectan de 5 a 10 días después de la inoculación (Blood et al, 1992).

2.6.6. Especies afectadas

Las ovejas son las anfitrionas por excelencia del LIV. Los casos clínicos también se han documentado en otros mamíferos, incluyendo ganado vacuno, cabras, caballos, llamas, alpacas, cerdos, perros, ciervos y alces europeos (tabla 6) (Jeffries et al, 2014). Se han reportado casos graves de infección natural o experimental entre urogallos rojos (*Lagopus scoticus*) y sus familiares (*Lagopus mutus* y *Lagopus lagopus*), incluyendo la perdiz nival. El LIV también puede infectar a una serie de pequeños mamíferos como musarañas, ratones de campo, ratas, liebres y conejos. (Schwentker et al, 1933; Blood et al, 1992; Iowa State University, 2009; Barrett et al, 2012).

Tabla 6. Especies animales afectadas por el Virus Louping Ill (LIV)

Especie	Referencia
Caballo (<i>Equus ferus caballus</i>)	Fletcher, 1937; Timoney, 1976; Hyde, 2007
Urogallo rojo (<i>Lagopus scoticus</i>)	Williams, 1963
Oveja (<i>Ovis aries</i>)	Smith, 1964a
Liebre (<i>Lepus timidus</i>)	Smith, 1964b
Perro (<i>Canis familiaris</i>)	MacKenzie, 1973
Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	Reid, 1976
Ciervo rojo (<i>Cervus alephus</i>)	Reid et al, 1978a
Urogallo rojo (<i>Lagopus scoticus</i>)	Reid et al, 1978b
Cerdo (<i>Sus scrofa</i>)	Bannatyne 1980; Ross, 1994
Cabra (<i>Capra aegagrus hircus</i>)	Gray et al, 1988; Balseiro et al, 2012
Bovino (<i>Bos taurus</i>)	Twomey, 2001; Benavides, 2011
Llama (<i>Lama glama</i>)	Macaldowie et al, 2005
Alpaca (<i>Vicugna pacos</i>)	Cranwell et al, 2008

Adaptado de: Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain (Jeffries et al, 2014)

En España el primer reporte de infección por LIV en ovejas en el País Vasco lo realizó Fernández de Luco en 1987. La infección se observaba desde hacía muchos años con un alto rango de morbilidad y mortalidad y era frecuente durante la primavera. Estos casos eran similares en aspectos clínicos, epidemiológicos, inmunológicos, etiológicos y lesionales a los casos de LI en Escocia. Los animales clínicamente enfermos presentaban meningoencefalitis no purulenta, con necrosis neuronal y fenómenos de neuronofagia. El agente causal presentaba una marcada relación antigénica con el LIV y se denominó virus de la encefalomiелitis ovina española (Fernández de Luco, 1991).

Balseiro et al (2012) reportaron el caso de un grupo de cabras españolas que enfermaron un mes después de ser trasladadas de una granja de la región sur hacia la parte norte en Asturias (España). Los primeros signos clínicos que manifestaron fueron cojera en miembros posteriores con incoordinación progresiva, fiebre, temblores musculares y exoftalmos. Se realizó la necropsia en dos cabras adultas en las que no se observaron lesiones macroscópicas en los diferentes órganos, sin embargo, en el examen histológico del SNC se pudo apreciar necrosis de las células de Purkinje y otras neuronas, infiltrado linfocítico en meninges, manguitos perivasculares y una evidente neuronofagia y gliosis. Los estudios de genética molecular permitieron identificar el virus SGEV que resultó idéntico en un 94% respecto a la cepa británica de LI y en un 93% a la variante ovina descrita en la región vasca. Este caso reveló la infección natural de otras especies además de la oveja, y la presencia del virus en la región norte de España (Balseiro et al, 2012).

Los casos reportados en perros describen la encefalitis y la muerte causada por LIV, pero se desconoce los niveles de viremia que puede alcanzar un individuo con LIV en esta especie (MacKenzie, 1973).

La infección por LIV reportada en llamas (*Lama glama*) describe que los animales enfermos presentaron anorexia, letargia y ataxia progresiva que terminó en decúbito y muerte de los animales en los días siguientes (Macaldowie et al, 2005). El análisis histopatológico del encéfalo indicaba una fuerte meningoencefalitis no supurativa en cerebelo, puente y médula oblongada caracterizada por un alto infiltrado linfoide perivascular, microgliosis

focal, necrosis de neuronas y neuronofagia. El análisis inmunohistoquímico en muestras de encéfalo reveló concentraciones de antígenos virales en neuronas con necrosis y neuronofagia, en células de Purkinje y en motoneuronas del puente y médula oblongada (Macaldowie et al, 2005).

2.6.7. Casos de infección en humanos

Existen casos bien documentados que informan de la infección adquirida en laboratorio por científicos que trabajaban con LIV. Pero el mayor riesgo lo presentan los ganaderos, trabajadores de mataderos, carniceros y veterinarios que tienen contacto con las ovejas u otras especies potencialmente infectadas (Schwentker et al, 1933; Blood et al, 1992; Iowa State University, 2009; Barrett et al, 2012). El potencial contacto de humanos con garrapatas en las zonas donde el LIV es endémico puede aumentar en el futuro debido a los cambios socioeconómicos y factores climáticos (es decir, el uso recreativo del campo o el cambio climático que produce cambios en las poblaciones de garrapatas) (Mansfield et al, 2009).

El primer reporte de infección en humanos se hizo en 1934, y describía cuatro casos en personal de laboratorio directamente involucrado con el LIV. El primer caso de infección natural ocurrida en humanos se reportó en 1948. Posteriormente se reportaron más casos de la enfermedad en trabajadores de laboratorio, el último en 1972 (Williams & Thorburn, 1962; Davidson et al, 1991; Mansfield et al, 2009; Jeffries et al, 2014).

En las infecciones adquiridas en laboratorio la enfermedad se caracteriza por fiebre de hasta 39.5 °C, dolor de cabeza, anorexia, mareos y rigidez muscular. Estos signos y síntomas son menos comunes en la enfermedad adquirida de forma natural y es posible que este síndrome febril a menudo no se detecte.

Los casos de infección con LIV reportados en Irlanda del Norte presentaron síntomas similares a la poliomiелitis. De 37 casos de humanos, solamente en 14 de ellos se manifestaba un episodio febril y en otros 18 pacientes se presentó fiebre bifásica (Davidson et al, 1991). La fase febril cursaba con un periodo corto de mejoría, para luego

pasar a una fase de encefalitis caracterizada por fiebre superior a 39,5 °C, fuerte dolor de cabeza, vómitos, somnolencia, rigidez de cuello y temblores de cabeza y extremidades (Williams & Thorburn, 1962; Davidson et al, 1991; Mansfield et al, 2009; Jeffries et al, 2014).

En las últimas décadas no se han reportado casos humanos de encefalitis por el LIV, aunque esto no está del todo claro porque se reportan numerosos casos de encefalitis de origen desconocido y algunos de ellos podrían ser casos de infección con LIV. Es posible que la falta de conciencia entre los médicos o una falta de pruebas específicas pudiera contribuir a esta ausencia de casos diagnosticados (Jeffries et al, 2014).

2.6.8. Cuadro clínico de LI en diferentes especies

En zonas endémicas muchos animales desarrollan infecciones subclínicas o clínicas en función de una serie de factores relacionados con el huésped y el medio ambiente. Estos signos clínicos iniciales en ovejas infectadas de forma natural son inespecíficos e incluyen fiebre bifásica que puede alcanzar los 42 °C, depresión, anorexia, y estreñimiento. Los signos clínicos preceden al segundo pico febril que ocurre alrededor del quinto día después que el virus invada el SNC (Blood et al, 1992). Los signos clínicos anteriores incluyen temblores musculares y/o rigidez, falta de coordinación, ataxia, hipersensibilidad al ruido y tacto, salivación y mordisqueo nervioso, progresando en algunos casos a la ataxia de la cabeza, parálisis posterior, postración, espasmos convulsivos y/o coma (Iowa State University, 2009). Cuando el virus no alcanza a invadir el SNC los animales se recuperan rápidamente y adquieren una inmunidad protectora duradera (Blood et al, 1992).

Las ovejas afectadas pueden presentar una forma inusual de caminar en saltos, llamada "marcha louping", durante la cual mueven ambas patas traseras o ambos miembros anteriores, hacia adelante al unísono. La muerte suele ocurrir después del curso clínico en pocos días e incluso de forma hiperaguda entre los animales con signos neurológicos y los animales que sobreviven a la infección pueden presentar signos nerviosos variables como déficit visual (Iowa State University, 2009).

La infección concomitante de ovejas con *Cytoecetes phagocytophila* o *Toxoplasma gondii* influyen en el resultado clínico de la infección por LIV, causando aumento de la patogenicidad del virus, aparentemente ejerciendo un profundo efecto inmunosupresor sobre el animal donde la viremia mayor y más prolongada que en las ovejas expuestas solamente al LIV (Reid et al, 1984; Reid & Pow, 1985; Jeffries et al, 2014). Aunque no hay diferencias en la susceptibilidad al LIV entre razas de ovejas se ha demostrado, que el curso clínico de la enfermedad puede variar con la edad, observándose diferencias entre corderos y adultos. Las crías de hembras inmunizadas y que son expuestas al virus pueden desarrollar una enfermedad terminal hiperaguda sobreviniendo la muerte dentro de las 48 horas después de la aparición de los signos clínicos (Reid et al, 1984; Reid & Pow, 1985; Jeffries et al, 2014).

En el ganado bovino la enfermedad se manifiesta con una marcha vacilante, hiperexcitabilidad, decúbito, ataxia de la cabeza, convulsiones y muerte. En cerdos, los lechones infectados pueden presentar una variedad de síntomas nerviosos como marcha tambaleante sin dirección, ataxia de la cabeza, espasmos musculares y convulsiones. En los caballos los casos naturales de infección con LI son muy raros y en la mayoría de los casos cursan de manera subclínica e inaparente (Reid & Pow, 1985).

En urogallos rojos infectados experimentalmente los signos clínicos que presentan son depresión, anorexia, regurgitación del contenido del buche durante la manipulación, y debilidad muscular, seguida de la muerte. Aunque se pueden encontrar lesiones en el SNC de estas aves, los signos neurológicos reportados no son obvios. En poblaciones silvestres de urogallo rojo se ha descrito la disminución del peso corporal y la baja supervivencia de los pollos, así como la muerte en aves de todas las edades (Reid et al, 1978b).

En humanos el LI puede presentarse de varias maneras y los análisis serológicos de los grupos de riesgo sugieren que la mayor parte de exposiciones son asintomáticas o resultan en un tipo de enfermedad gripal con fiebre, dolor de cabeza y ligera rigidez muscular, o en una enfermedad similar a la poliomielitis o fiebre hemorrágica, pero la infección rara vez es mortal (Williams & Thorburn, 1962).

2.6.9. Cuadro lesional

a. Lesiones macroscópicas

El LI no causa lesiones macroscópicas características en SNC (Jubb & Palmer's, 2015), con la posible excepción de la congestión de los vasos meníngeos y, en algunos casos, neumonía (Fernández de Luco, 1991; Jeffries et al, 2014).

b. Lesiones microscópicas

La enfermedad se caracteriza por una meningoencefalitis aguda y las lesiones histopatológicas consisten en meningitis y encefalomiелitis no supurativa. En la sustancia blanca se aprecian manguitos perivasculares, focos de gliosis y leptomeningitis leve. Las lesiones inflamatorias son más evidentes que en la mayoría de las encefalitis virales. La inflamación puede ser desde leve a muy grave con presencia de neutrófilos en los casos muy graves, y por lo general restringida a la materia gris. En las ovejas y en las cabras, estas lesiones se observan principalmente en el tronco encefálico y el cerebelo, así como en el asta ventral de la médula espinal (Marín et al, 1995; Jubb & Palmer's, 2015; Balseiro et al, 2012).

Es común observar degeneración neuronal, que puede ser grave, y una prominente neuronofagia con alteración selectiva de las células de Purkinje del cerebelo. En muchos casos, la gravedad depende en gran medida de la duración de la infección activa. En la médula espinal la poliomiелitis es la lesión más característica especialmente en la región cervical. En el caso de las ovejas no se han observado cuerpos de inclusión, pero sí inclusiones intracitoplasmáticas acidófilas (Doherty et al, 1972; Jubb & Palmer's, 2015).

También se ha informado de meningoencefalitis no supurativa en urogallos infectados experimentalmente, pero las lesiones ocurren principalmente en el cerebro y los lóbulos ópticos del cerebro medio (Reid et al, 1978). En infecciones experimentales de monos y ratones se presentan inclusiones virales en neuronas del tronco cerebral y médula espinal. Por inmunohistoquímica se puede identificar el antígeno viral fácilmente, sobre todo en las células de Purkinje del cerebelo (Jubb & Palmer's, 2015).

2.6.10. Respuesta inmune

La respuesta inmune desencadenada puede ser tanto humoral como celular, y ambas son importantes para el control de la infección primaria y la prevención de futuras infecciones por *Flavivirus*. La IgM circulante se sintetiza a los 6 días del comienzo de la infección, seguida de la producción de IgG. Los anticuerpos bloquean la diseminación del virus y la infección subsiguiente de otros tejidos (Reid et al, 1971).

La inmunidad frente a un *Flavivirus* puede conferir un cierto grado de protección frente a la infección por otros *Flavivirus* al reconocer los antígenos comunes expresados por todos los virus de la familia. La inmunidad frente a estos virus es un arma de doble filo, donde la inmunidad celular también desempeña una notable función en el control de la infección primaria. En este caso un anticuerpo no neutralizante puede favorecer la entrada de los *Flavivirus* en los macrófagos y otras células. Este tipo de anticuerpos se pueden generar frente a una cepa relacionada de virus en la que el epítipo neutralizante no se exprese o sea diferente (Murray et al, 2006). La inflamación derivada de la respuesta inmune celular puede destruir los tejidos y contribuir significativamente a la patogenia de la encefalitis. También pueden observarse reacciones de hipersensibilidad retardada, formación de inmunocomplejos con viriones y antígenos víricos, y la activación del complemento (Murray et al, 2006).

2.6.11. Morbilidad y mortalidad

La morbilidad y mortalidad varían según el estado inmunológico del animal, las infecciones concurrentes y otros factores. La incidencia de LI en ovejas adultas suele ser baja, a menos que sean trasladadas recientemente desde un área libre a una zona endémica con esta enfermedad. Aquí la tasa de mortalidad puede alcanzar el 60% y la mayoría de los casos se producen en los animales menores de dos años. La mayoría de los casos de encefalomielitis ovina se producen en primavera, principios de verano y otoño, cuando las garrapatas son más comunes. Los corderos nacidos en estas áreas suelen estar protegidos por los anticuerpos maternos durante los primeros meses de vida, y los animales adultos son capaces de desarrollar inmunidad. Una vez que una oveja ha desarrollado encefalitis, la tasa de letalidad es de aproximadamente el 50% (Iowa State University, 2009).

El urogallo rojo es muy susceptible a LI, y en áreas donde la garrapata *Ixodes ricinus* es común estas aves resultan seropositivas hasta en un 84% y la tasa de mortalidad puede ser hasta del 80%. En otras aves silvestres también se ha reportado mortalidad y la supervivencia de los polluelos puede ser muy baja en zonas endémicas (Reid et al, 1978). En el hombre aunque la infección suele ser inusual y ocurre principalmente en personas expuestas al virus la recuperación suele ser rápida y normal (Jubb & Palmer's, 2015).

2.6.12. Diagnóstico

a. Diagnóstico clínico

Se debe sospechar de LI cuando las ovejas presentan fiebre y signos neurológicos, sobre todo cuando el rebaño se ha movilizado o introducido recientemente en áreas infestadas por garrapatas. Los signos clínicos no parecen ser específicos en urogallos, y se debe considerar una amplia variedad de enfermedades que cursan con encefalomiелitis (Iowa State University, 2009).

b. Diagnóstico diferencial

El LI en el ganado ovino puede confundirse clínicamente con una amplia gama de enfermedades infecciosas y no infecciosas, incluyendo scrapie, toxemia de la gestación, hipocalcemia, tétanos, listeriosis, fiebre por garrapata, hipocuprosis, rabia, hidatidosis, y tóxicos vegetales (Blood et al, 1992; Jubb & Palmer's, 2015).

Los casos de la enfermedad en bovinos deben diferenciarse de la fiebre catarral maligna, listeriosis, pseudorrabia, EEB, rabia, hipomagnesemia, hipocalcemia, envenenamiento agudo por plomo e intoxicación por ciertos tóxicos vegetales. Con la excepción de la necesidad de distinguir LI de otras encefalomiелitis virales, el diagnóstico diferencial no está previsto para los animales domésticos debido a la poca frecuencia de la enfermedad en estas especies. En los seres humanos, la infección por el LIV puede ser confundida con una gama de agentes que pueden causar meningitis o meningoencefalitis (Iowa State University, 2009).

c. Recolección de muestras

Durante la fase aguda (viremia) de LI puede aislarse el virus a partir de muestras de sangre, por lo que es preferible hacer el aislamiento en los primeros 3-4 días después del inicio de la fiebre. La viremia por lo general termina en el momento en que el animal desarrolla signos neurológicos. En animales que muestran signos nerviosos el aislamiento del virus se puede realizar por tiempo indeterminado, y en la mayoría de los casos se hace a partir del cerebro y de la médula espinal de los animales que mueren (Marston et al, 2013).

Durante la necropsia se deben tomar muestras de encéfalo y de la porción cervical de la médula espinal y es preferible transportar las muestras en glicerol al 50 % o en solución salina normal o congelados. Muestras de cerebro y porciones de la médula espinal deben ser remitidas para estudio histopatológico en formalina al 10% (Reid et al, 1971).

d. Pruebas de laboratorio

El diagnóstico serológico incluye inhibición de la hemaglutinación, seroneutralización, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y fijación del complemento (Murray et al, 2006). La detección de IgM específica para el virus mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación permite el diagnóstico a partir de muestras de suero cuando la infección es reciente, ya que los anticuerpos aparecen de 5 a 10 días después de la infección y éstos disminuyen después de 6-12 meses. Cuando se practican pruebas serológicas, pueden ocurrir reacciones cruzadas con otros *Flavivirus* (Reid et al, 1978a; Murray et al, 2006; Iowa State University, 2009).

En el Reino Unido la serología se utiliza ampliamente para evaluar la prevalencia del virus LI en diferentes hospedadores. Actualmente existe una vigilancia limitada para el virus en la fauna, y las estimaciones de prevalencia y distribución se basan en los animales de granja recibidos en laboratorios o sometidos a necropsia con signos neurológicos sospechosos de infección por el LIV (Marín et al, 1995; Balseiro et al, 2012; Jeffries et al, 2014).

El diagnóstico definitivo de LI se basa en el aislamiento del virus a partir de muestras de encéfalo y médula espinal ya que a partir de la sangre es menos factible cuando la fase de viremia ha finalizado. Este virus puede ser aislado en líneas celulares de riñón porcino, ovino o hámster, así como en huevos embrionados, y mediante la inoculación intracerebral en ratones lactantes (Blood et al, 1992; Iowa State University, 2009).

También se utiliza la prueba de tinción por inmunohistoquímica y la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para la detección de antígenos virales o ácidos nucleicos en el SNC (Iowa State University, 2009; Marston et al, 2013). La aplicación de la técnica inmunohistoquímica utilizando el complejo de inmunoperoxidasa avidina-biotina (ABC) tiene éxito en la detección del LIV en muestras de encéfalo y médula espinal fijado con formalina de casos de infecciones naturales o experimentales (Murray et al, 2006; Iowa State University, 2009).

2.6.13. Control

La forma más fácil de prevenir la diseminación de cualquier flavivirus consiste en el control de sus vectores y sus zonas de reproducción (Murray et al, 2006). El uso frecuente de acaricidas de inmersión o pulverizados en ovejas y en ganado en general durante el período de la actividad máxima de la garrapata es un medio valioso para controlar el nivel de infestación por garrapatas y la posible transmisión del virus. Las medidas encaminadas a reducir las poblaciones de garrapatas en pastos infestados resultan poco prácticas para el control del LI en zonas endémicas de la enfermedad. El medio más eficaz para controlar la enfermedad LI en zonas endémicas es la vacunación (Blood et al, 1992).

La vacunación a grupos de animales trasladados a zonas endémicas debe realizarse al menos un mes antes de la exposición a la infección debido a que el LIV se mantiene en un ciclo garrapata/oveja por largos periodos. En ovejas gestantes se recomienda la vacunación en el último tercio de gestación para que éstas puedan proporcionar inmunidad pasiva a sus corderos a través del calostro, y éstos estén protegidos durante los meses críticos iniciales de vida (Blood et al, 1992; Iowa State University, 2009).

Es aconsejable vacunar a los corderos después del destete cuando la inmunidad materna ha disminuido, especialmente en zonas donde hay una "subida" secundaria de la actividad de las garrapatas. Se recomiendan dos dosis de la vacuna con un intervalo de 2 a 8 semanas entre las inyecciones para lograr una óptima protección a la infección natural. Se recomienda hacer vacunaciones sistemáticas del rebaño durante un período de varios años para lograr la eliminación del virus (Iowa State University, 2009).

2.7. Agentes tóxicos como causa de alteraciones nerviosas en cabras

Las neuropatías tóxicas, generalmente son de tipo crónico y la historia y el cuadro clínico pueden facilitar su diagnóstico. Son muchos los compuestos orgánicos, inorgánicos, metales pesados y plantas que pueden causar daños (procesos degenerativos) en el SN de rumiantes (Pugh, 2002).

2.7.1. Plantas tóxicas

Las consecuencias, frecuencia y distribución geográfica de las intoxicaciones por plantas ocurren por diversos factores como, el tipo y concentración del agente tóxico, y la fase de desarrollo vegetativo en que es consumida por el animal (tabla 7). Ciertos tipos de plantas poseen diferencias de toxicidad aún dentro de la misma especie, influenciado también por el tipo de suelo y la disponibilidad de agua para su desarrollo. Otros factores que influyen son la dosis ingerida, la sed y la palatabilidad de los animales que suelen consumir este tipo de plantas (Colorado State University, 2017).

Las plantas y hongos tóxicos pueden clasificarse de acuerdo a la naturaleza química de sus constituyentes metabólicos, pudiendo estar constituidos por una sustancia única, o bien por varias sustancias similares con propiedades químicas muy diferentes. En muchos casos, el componente tóxico no se logra determinar, incluso la presencia de un principio tóxico en una planta no significa que el consumo de ésta necesariamente produzca intoxicación. La clasificación de las toxinas vegetales en grupos químicos o por los efectos adversos producidos, ya sea a nivel del sistema digestivo, del sistema nervioso central, o bien, daños en la piel, resultan útiles para emitir un diagnóstico sobre la planta implicada (Cooper & Johnson, 1998).

En las plantas pueden estar presentes uno o varios compuestos tóxicos, “las llamadas toxinas intrínsecas”, que provoquen más de una respuesta o alteración en el organismo. Otros pueden ser derivados del metabolismo de la planta una vez ingerida por el animal, como es el caso de los glucósidos cianogénicos, que se vuelven altamente tóxicos después de la acción de las enzimas liberadas durante el proceso de digestión (por la liberación de ácido cianhídrico). En ciertos casos las plantas o los productos vegetales se vuelven tóxicos cuando se contaminan con hongos que liberan micotoxinas que pueden ser las responsables de erupciones en piel o reacciones de fotosensibilidad, por ejemplo, la patata que puede liberar altas cantidades de solanina, un alcaloide que se vuelve altamente tóxico cuando se expone por mucho tiempo a la luz solar intensa (Cooper & Johnson, 1998).

La susceptibilidad de las diferentes especies animales a la acción tóxica de ciertas plantas es variable, en parte, debido a la dieta, a la anatomía del tracto digestivo y el comportamiento alimenticio. En el caso de los rumiantes, que tienen un tracto digestivo relativamente grande ciertas sustancias tóxicas se pueden diluir antes de ser absorbidas por el tracto intestinal, o el caso de los caballos y cerdos donde el paso de la sustancia puede ser más lento antes de ser absorbida. A menudo se asume que las cabras pueden comer de manera segura casi cualquier cosa, pero ciertamente no es así, en condiciones naturales, el patrón de alimentación indica que ciertos animales pueden ser selectivos evitando cierto tipo de plantas perjudicialmente tóxicas, no así, en aquellos casos de los animales más jóvenes que no suelen ser selectivos. Pero uno de los factores más importantes entre especies podría ser el mecanismo de desintoxicación específicos, que incluso puede variar entre individuos de la misma especie (Cooper & Johnson, 1998).

Una vez ingerida la planta, los agentes tóxicos de ésta pueden afectar el tracto digestivo del animal de varias maneras, algunas causan estomatitis, gastroenteritis o irritación del estómago o del intestino, que desencadenan en dolor abdominal, vómitos (en animales que puede vomitar) y diarrea o estreñimiento (Cooper & Johnson, 1998).

Después de la absorción en el tracto digestivo, los principios tóxicos pasan al hígado, donde se produce la descomposición y desintoxicación enzimática. Sin embargo, puede

ocurrir un daño hepático como sucede en aquellos animales que comen plantas ricas en alcaloides pirrolizidínicos. Cuando la función hepática está alterada, ciertos pigmentos biliares, en lugar de ser eliminados a través de la secreción biliar, ingresan en la circulación sanguínea general, y llegan a los capilares de la piel donde pueden ser activados por la radiación ultravioleta y causar el síndrome de fotosensibilización. Otros agentes tóxicos circulantes en sangre pueden destruir glóbulos rojos y causar anemias como efecto directo. Ciertas plantas pueden contener grandes cantidades de oxalatos que pueden combinarse con el calcio en sangre y formar oxalato de calcio insoluble y provocar hipocalcemia (Cooper & Johnson, 1998).

Los riñones, los órganos principales de la excreción, pueden verse afectados por sustancias tóxicas que pasan a través de ellos (por ejemplo, oxalato). En muchos casos mortales, el efecto del tóxico es sobre el músculo cardíaco o directamente sobre las células nerviosas de éste (Cooper & Johnson, 1998). Es probable que los signos nerviosos, de tipo excitatorio o depresivos, ocupen el segundo lugar en frecuencia en los casos de intoxicación por plantas y, cuando estos están presentes, generalmente no se encuentran cambios macroscópicos e histológicos manifiestos en el tejido nervioso (Cooper & Johnson, 1998).

*2.7.2. Alteraciones neurológicas provocadas en cabras por el consumo de plantas del género *Ipomoea**

Las plantas del género *Ipomoea* (por ejemplo, *Ipomoea carnea*) pertenecen a la familia CONVOLVULACEAE, producen toxinas vegetales (alcaloides) que se usan como fuentes de drogas que actúan sobre el SNC. Los alcaloides obtenidos de estas plantas se utilizan actualmente en el tratamiento de una amplia gama de enfermedades, especialmente como psicoactivos y agentes vasoconstrictores. Esta clase de moléculas pertenecen al grupo de alcaloides indol y se pueden clasificar según sus estructuras en: clavines, ergoamidas y péptidos (ergopeptinas) (Carlini & Ligabue-Braun, 2017). Este género de plantas es endémico en Nicaragua (Aguirre et al, 2009).

Las plantas crecen en agrupamientos densos coincidiendo con la época seca del año y la carencia de forrajes, momento en el que los animales las consumen en gran cantidad. Para

que en el animal se presenten los signos clínicos de intoxicación éstas deben ser consumidas por largos periodos, pudiendo presentarse éstos mucho tiempo después de haberse iniciado el consumo (Caspé et al, 2008). Algunos animales muestran gran apetencia hacia el consumo de esta especie, lo cual posiblemente conduzca a una adicción (Caspé et al, 2008; Ríos et al, 2015). El componente tóxico de este género de plantas son los alcaloides *swainsonina* y *calisteginas* (Ríos et al, 2015; Hao et al, 2015a; Hao et al, 2015b).

Estas plantas producen “ α -manosidosis”, una enfermedad por almacenamiento lisosomal que ocurre secundariamente a la ingestión de estas plantas que producen el alcaloide swainsonina y, que afecta principalmente a las células de Purkinje del cerebelo cursando con grave disfunción cerebelosa (de Lahunta & Glass, 2009). El mecanismo de toxicidad de este alcaloide ha sido demostrado en diferentes estudios sobre intoxicación con plantas de diferentes géneros (*Astragalus*, *Oxitropis*, *Ipomoea*, y *Sida*), atribuyéndole efecto inhibitor de glicoproteínas como la α - manosidasa II en el aparato de Golgi. La swainsonina interviene en las rutas metabólicas de glicosilación de carbohidratos esenciales para la función celular, formando en su lugar glúcidos híbridos (manosidasa y glucosidasa) que tienden a ser expulsados, o bien, se acumulan en las células produciendo las alteraciones por almacenamiento (de Lahunta & Glass, 2009; Ríos et al, 2015; Hao et al, 2015a; Hao et al, 2015b; Cortinovis & Caloni, 2015).

La clínica presentada por el consumo de plantas del género *Ipomoea* se caracteriza por movimientos oscilatorios laterales de la cabeza, nistagmos, ataxia, temores, balanceo, caída del tercio posterior, dificultad para levantarse, y paresia. Otros signos observados son: pérdida de peso, disminución de la frecuencia de ruidos ruminales, anemia, retardo en el tiempo de llenado capilar y anormalidades del pliegue cutáneo (Caspé et al, 2008; Ríos et al, 2015).

Estudios científicos realizados en Brasil asocian un cuadro similar al consumo de plantas de la especie *Ipomoea sericophylla* e *Ipomoea riedelii*. Los signos clínicos observados se caracterizaban por incoordinación, hipermetría o pasos laterales, paresia espástica, ataxia, reacciones posturales anormales, nistagmos e inapetencia. Otros signos observados fueron

depresión, pelo hirsuto y opaco y pérdida de peso (Medeiros et al, 2003; Barbosa et al, 2006). Durante la necropsia de los animales no se observaron lesiones macroscópicas significativas. Las lesiones microscópicas fueron vacuolización de pericarion de neuronas en todo el SNC con mayor prominencia en las células de Purkinje. En la capa granular del cerebelo, en la sustancia blanca, en los pedúnculos cerebelosos y en el núcleo cerebelar se pudieron observar esferas en axones (Medeiros et al, 2003; Barbosa et al, 2006).

Carvalho de Lucena et al (2014) reportaron las alteraciones presentadas por un grupo de ovejas intoxicadas experimentalmente con *Ipomoea asarifolia*. Todas las ovejas intoxicadas tuvieron signos clínicos similares caracterizados por temblor muscular en cabeza y cuello y movimientos laterales de la cabeza. Cuando se les forzaba al movimiento presentaban ataxia con desviación y rigidez de las extremidades (Carvalho de Lucena et al, 2014).

La planta *I. asarifolia* ha sido relacionada con intoxicación en ovejas, cabras, vacas y búfalos, especialmente durante la época seca cuando hay carencia de forrajes. La mayoría de los signos clínicos observados en las diferentes especies consistieron en temblor muscular, movimientos de la cabeza y cuello e incoordinación de la marcha. Cuando los animales afectados eran obligados a moverse presentaban ataxia cerebelosa, rigidez de los miembros y posturas inusuales. Generalmente los animales se recuperaban, pero cuando ocurría la muerte no se encontraban lesiones macroscópicas ni microscópicas, aunque en casos de intoxicaciones crónicas se observó degeneración de las células de Purkinje en cerebelo (Carvalho de Lucena et al, 2014).

En Mozambique se presentó un caso de campo en cabras intoxicadas por *I. carnea*, donde las cabras intoxicadas presentaron ataxia de la cabeza, hiperestesia y nistagmos. En la necropsia se pudo apreciar congestión de las meninges y edema de la región lumbar de la médula espinal, y una de las cabras presentó una marcada asimetría y atrofia del cerebelo. A nivel microscópico se observó degeneración y pérdida de las células de Purkinje, vacuolización del citoplasma en las células de Purkinje en el cerebelo, en la corteza cerebral, en el tálamo y en el tronco encefálico (de Balogh et al, 1999).

Algunas de las células de Purkinje persistentes presentaron citoplasma condensado y núcleos hipercromáticos. En las zonas de pérdida de células se apreciaba vacuolización, gliosis en la capa granular y proliferación de astrocitos. En el citoplasma de las células gliales y del neuropilo se observaron pequeñas cantidades de lipofucsina (de Balogh et al, 1999).

Tabla 7. Plantas tóxicas asociadas con alteraciones neurológicas en cabras y ovejas

Alteración	Planta	Síntomas
Parálisis	<i>Astragalus</i> , <i>Oxytropis</i> <i>Delphinium</i>	Emaciación, déficit propiceptivo, parálisis y marcha vacilante. Tics nerviosos de rápido inicio en músculos, parálisis y muerte.
Convulsiones o estimulación del SNC*	<i>Apocynium</i> <i>Asclepias</i> <i>Cicuta</i> <i>Conium</i> <i>Corydalis</i>	Convulsiones, debilidad, coma. Convulsiones, coma, muerte. Inicio rápido, extremadamente tóxica, convulsiones. Temblores, incoordinación, parálisis respiratoria. Aparición rápida, ataxia, tics de músculos faciales, convulsiones, movimientos masticatorios.
Estimulación y depresión del SNC* o efectos nerviosos centrales mixtos	<i>Delphynium</i> <i>Aesculus</i> <i>Datura</i> <i>Eupatorium</i> <i>Haploppus</i> <i>Kalmia</i> <i>Rhodendrum</i> , <i>Leucathoe</i> <i>Lupinus</i> <i>Ricinus</i> <i>Solanacea</i> <i>Veratrum</i> <i>Zigadenus</i>	Excitabilidad, vómitos, convulsiones, marcha vacilante. Vómitos, ataxia, temblores, convulsiones, hiperestesia, excitación o depresión. Ataxia, tremor, alucinaciones, midriasis, taquicardia, taquipnea. Temblor en el hocico y las piernas después del ejercicio, debilidad, dificultad para respirar. Depresión, paso rígido, debilidad, recumbencia, coma y muerte. Convulsiones, vómito, debilidad, parálisis y muerte. Incoordinación, vómito, debilidad, espasmos, coma y muerte. Depresión, nerviosismo, convulsiones, espasmos y muerte. Diarrea, abatimiento, debilidad, temblores e incoordinación. Depresión, midriasis, bradicardia e incoordinación. Vómitos, arritmia, debilidad, convulsiones y coma. Debilidad, tambaleo, sialorrea, convulsiones y coma.
Depresión o debilidad	<i>Halogeton</i> <i>Helenium</i> <i>Hymenoxys</i> <i>Oxytemia</i> <i>Sarcobatus</i> <i>Tetradymia</i>	Respiración rápida y superficial. Depresión, debilidad y vómitos crónicos. Depresión, hinchazón, debilidad y descarga nasal verde. Depresión, debilidad, coma. Abatimiento, descarga nasal, babeo y debilidad. Depresión, debilidad, hinchazón alrededor de la cabeza, descamación de la piel.

Tomado de: Sheep and Goat Medicine & U.S. Food and Drug Administration (FDA). (Freeman & Moore, 1974; Pugh, 2002)

*SNC: Sistema Nervioso Central.

V. OBJETIVOS

1. Objetivos generales

- 1.1. Determinar la relación existente entre la patogenia y la patología manifestada por cabritos y corderos infectados experimentalmente con el Spanish Goat Encephalitis Virus (SGEV) frente a los casos naturales reportados con el fin de avanzar en el conocimiento epidemiológico de la enfermedad y en el establecimiento de medidas de control aplicables en el campo.
- 1.2. Determinar el agente causante de las alteraciones nerviosas en cabras de Nicaragua mediante el estudio epidemiológico y patológico para establecer las medidas de prevención y control que ayuden a la reducción de la incidencia de esta enfermedad.

2. Objetivos específicos

- 2.1. Evaluar la distribución, gravedad y evolución de las lesiones en los cabritos y corderos infectados experimentalmente con el SGEV frente a los infectados naturalmente.
- 2.2. Evaluar las diferencias en la distribución de las lesiones y su relación con los signos clínicos, la respuesta inmune y la viremia en cabritos y corderos infectados experimentalmente con SGEV.
- 2.3. Evaluar la eficacia de una vacuna comercial frente a louping ill en cabritos infectados experimentalmente con SGEV.
- 2.4. Identificar el agente responsable y describir las lesiones observadas en cabras con alteraciones nerviosas en Nicaragua.
- 2.5. Diseñar un Sistema de Gestión Sanitaria y control frente a un brote de SGEV y frente al agente responsable de las alteraciones nerviosas en cabras en Nicaragua.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Infección experimental con Spanish Goat Encephalitis virus (SGEV)

1.1. Selección y tratamiento de los animales

En el experimento se utilizaron 40 animales, 18 cabritos y 22 corderos, que fueron seleccionados en Castilla y León, lugar donde no se han reportado casos de SGEV. El experimento se llevó a cabo en dos fases, la primera parte del estudio se realizó con los cabritos y la segunda con los corderos. Los procedimientos para realizar la infección experimental y muestreo fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación Animal de la Junta de la Comunidad de Castilla y León, España (número de referencia ULE-010-2015). En ambas fases del experimento se cumplieron con los requisitos legales y directrices españolas y europeas actuales con respecto a las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (RD53/2013), incluyendo la docencia.

Todos los animales utilizados durante el experimento estaban libres de enfermedades y heridas. Una semana antes de iniciar el experimento cada uno de los animales fue tratado con un antiparasitario externo para prevenir infestaciones por garrapatas transmisoras de SGEV y otras encefalitis. Los cabritos y corderos se dividieron en subgrupos de nueve miembros cada uno (n=9), y en el caso de los corderos se usaron cuatro animales (n=4) como subgrupo control. Antes de la vacunación de los cabritos y de la infección experimental de los corderos se tomó una muestra de sangre de cada uno de los animales en estudio para confirmar la presencia o ausencia de niveles de anticuerpo frente a *Flavivirus* europeos causantes de TBE.

Un subgrupo de cabritos (n=9) fue vacunado frente a LI vía subcutánea a dosis de un mililitro por animal, según las instrucciones del fabricante de la vacuna comercial (MSD®, Animal Health). La vacuna utilizada tiene licencia para su uso en ovejas y está basada en el virus inactivado. Aunque las ovejas requieren de una dosis única de vacuna, se recomienda que cualquier otra especie reciba dos dosis con 2 semanas de diferencia (comunicación personal, Hugh Reid). Por lo tanto, los cabritos recibieron dos dosis de la vacuna con este intervalo y posteriormente se clasificaron en subgrupos de vacunados y no vacunados. Cada subgrupo se estabuló en boxes separados, donde se les garantizó confort térmico y físico,

suministro de agua y alimento a disposición necesarios para su desarrollo y bienestar. En el caso de los corderos no se vacunó a ningún animal porque se pretendía demostrar la patogenicidad de SGEV usando las vías de inoculación intravenosa y subcutánea para, posteriormente, comparar los resultados obtenidos entre sí y con los obtenidos en cabritos.

1.2. Protocolo de infección experimental con SGEV usado en cabritos y corderos

El inóculo utilizado en el experimento originalmente fue aislado del cerebro de una cabra enferma del brote registrado en Asturias en 2011 y contenía 1.4×10^7 PFU/ml de SGEV. El día cero del experimento, a los cabritos de cada subgrupo (vacunados y no vacunados) se le aplicó vía subcutánea en la región costal derecha (paralelo al codo) un mililitro de suspensión de SGEV. En el caso de los corderos divididos en subgrupos según la vía de inoculación (subgrupo subcutáneo y subgrupo intravenoso), se les aplicó la misma dosis que en el caso de los cabritos y usando el mismo protocolo para la vía subcutánea. La inoculación por vía intravenosa (IV) se realizó en la vena yugular derecha, a razón de un mililitro por animal. El subgrupo control de corderos (n=4) no fue inoculado porque fueron utilizados como controles negativos.

1.3. Período de estudio, toma de muestras y evaluación de signos clínicos de los cabritos y corderos infectados experimentalmente

La parte experimental se inició con la vacunación de los animales (en el caso de los cabritos). Dos semanas post vacunación, el llamado día cero, se inoculó el virus y culminó con el sacrificio y necropsia del último animal a los 21 días post infección. Posteriormente se analizaron las muestras obtenidas para cada estudio, procedimiento que se realizó por separado para los cabritos y los corderos.

Después de la inoculación, desde el día uno hasta el octavo día post infección, diariamente se tomó la temperatura rectal y muestras de sangre de cada animal. Posteriormente a partir del día 9, estos procedimientos se realizaron cada dos días hasta el sacrificio del último animal. Se valoraron signos neurológicos y otros signos indicativos de alteración patológica, incluyendo condición corporal. Se usaron valores numéricos para cada observación (sin

signos patológicos, 0; con signos patológicos no neurológicos, 1; y con signos patológicos de tipo neurológico, 2).

1.4. Estudios realizados en los cabritos y corderos infectados con SGEV

La sangre obtenida de cada animal fue centrifugada y los sueros obtenidos se usaron para la determinación de la respuesta inmune humoral de IgM e IgG mediante ELISA de FSME (TBE) (PROGEN[®], Heidelberg, Alemania), que reconoce anticuerpos contra *Flavivirus* causantes de TBE. A cada muestra de suero también se le realizó la prueba de ensayo de qRT-PCR TaqMan en tiempo real en un solo paso para obtener ARN viral usando el kit de extracción de virus Speedtools RNA (Biotools, Madrid, España), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A cada cabrito y cordero se les practicó eutanasia y necropsia siguiendo protocolos actuales para animales de experimentación. Durante la necropsia detallada de cada animal se valoraron lesiones macroscópicas y se tomaron muestras para el estudio histopatológico de cada órgano, en especial de cada una de las regiones del SNC que fue extraído entero y fijado en formol al 10%. Posteriormente las muestras seleccionadas fueron cortadas en secciones de 4 mm y montadas en bloques de parafina para realizar cortes histológicos de 3 µm que se tiñeron con hematoxilina eosina (H/E) y luego fueron evaluadas con el microscopio óptico para describir las lesiones histológicas que se clasificaron de acuerdo con su gravedad y extensión en grado I, II, III o IV.

2. Estudio patológico en cabras con síndrome neurológico en Nicaragua

2.1. Animales seleccionados para el estudio

El estudio patológico se realizó en 8 cabras con alteraciones neurológicas procedentes del municipio Malpaisillo (León, Nicaragua).

2.2. Recolección de datos, muestras para análisis y técnicas diagnósticas

Para el diagnóstico se recurrió a la anamnesis, a la exploración clínica y al examen neurológico detallado en los animales enfermos con el fin de determinar la naturaleza,

duración y progresión de las alteraciones neurológicas. Se realizaron pruebas complementarias como biometría hemática completa, bioquímica sanguínea y análisis de orina para medir los valores fisiológicos que indicaran alguna desviación, y a la vez poder realizar análisis comparativos con los valores normales de referencia reportados para la especie caprina.

Las cabras con alteraciones neurológicas fueron eutanasiadas y sometidas a necropsia siguiendo los protocolos establecidos para animales domésticos y de experimentación. Durante la necropsia se evaluaron alteraciones patológicas macroscópicas y se extrajeron muestras de LCR para cultivo bacteriano y análisis citológico. También se obtuvieron muestras de tejidos de cada uno de los órganos, en especial del SNC y periférico que se fijaron en formol al 10%. Posteriormente se obtuvieron secciones de 4 mm de grosor de los órganos y cada una de las regiones encefálicas, que se incluyeron en parafina, se cortaron en secciones de 3 μ m de grosor y se tiñeron con H/E para su estudio histopatológico.

Las muestras del encéfalo que presentaron alteraciones histopatológicas se cortaron a 10 μ m de grosor y se tiñeron con las tinciones especiales Krüber Barrera y Fon Kossa. Una tercera sección de muestras del encéfalo fue cortada a 3 μ m de grosor para análisis inmunohistoquímico con la proteína glial fibrilar (GFAP+) e histoquímica usando concanavalina A para un análisis más preciso de las alteraciones observadas.

3. Análisis estadístico

En cada fase experimental con SGEV y en el estudio de las cabras con síndrome neurológico la tabulación general de los datos recolectados se hizo con el programa estadístico Excel de Microsoft Office. El análisis estadístico de datos cuantitativos obtenidos en el estudio experimental con SGEV como temperatura rectal, carga de ARN viral de SGEV y los niveles de anticuerpos IgG e IgM contra *Flavivirus* europeos se hizo mediante análisis de varianza para detectar diferencias entre grupos usando el procedimiento GLM (paquete estadístico, SAS Inc., North Carolina, USA). Para el análisis de diferencias entre pares de medios mínimos cuadrados se aplicó la prueba t de Tukey-Kramer para comparaciones múltiples en el mismo paquete estadístico. Un valor de $P < 0.05$, fue considerado como

significativo. Para el análisis estadístico de variables independientes entre corderos y cabritos se realizó una comparación entre grupos mediante la prueba t de student utilizando el programa estadístico SPSS versión 23.

Con los datos obtenidos de las cabras con síndrome neurológico se realizó un análisis multivariable para determinar diferencias entre las medias y como prueba *post hoc* se empleó un análisis de Diferencias Significativa Mínima (DMS) utilizando el programa SPSS Statistics versión 23. Un valor de $P < 0.05$ fue considerado significativo.

**VII. TRABAJOS PUBLICADOS EN REVISTAS
CIENTÍFICAS**



EXPERIMENTALLY INDUCED DISEASE

1. Trabajo #1. Vaccination against Louping Ill Virus Protects Goats from Experimental Challenge with Spanish Goat Encephalitis Virus

L. M. Salinas^{*}, R. Casais[†], J. E. García Marín^{*}, K. P. Dalton[‡], L. J. Royo[†],
A. del Cerro[†], E. Gayo^{*}, M. P. Dagleish[§], P. Alberdi^{||}, R. A. Juste[†],
J. de la Fuente^{||} and A. Balseiro[†]

^{*}Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, [†]SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Centro de Biotecnología Animal, Gijón, Asturias, [‡]Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Campus El Cristo, Oviedo, Asturias, Spain, [§]Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, Near Edinburgh, Scotland, UK and ^{||}SaBio, IREC (CSIC – UCLM – JCCM), Ronda de Toledo, Ciudad Real, Spain

Spanish goat encephalitis virus (SGEV) is a recently described member of the genus *Flavivirus* belonging to the tick-borne encephalitis group of viruses, and is closely related to louping ill virus (LIV). Naturally acquired disease in goats results in severe, acute encephalitis and 100% mortality. Eighteen goats were challenged subcutaneously with SGEV; nine were vaccinated previously against LIV and nine were not. None of the vaccinated goats showed any clinical signs of disease or histological lesions, but all of the non-vaccinated goats developed pyrexia and 5/9 developed neurological clinical signs, primarily tremors in the neck and ataxia. All non-vaccinated animals developed histological lesions restricted to the central nervous system and consistent with a lymphocytic meningomyeloencephalitis. Vaccinated goats had significantly ($P < 0.003$) greater concentrations of serum IgG and lower levels of IgM ($P < 0.0001$) compared with unvaccinated animals. SGEV RNA levels were below detectable limits in the vaccinated goats throughout the experiment, but increased rapidly and were significantly ($P < 0.0001$) greater 2–10 days post challenge in the non-vaccinated group. In conclusion, vaccination of goats against LIV confers highly effective protection against SGEV; this is probably mediated by IgG and prevents an increase in viral RNA load in serum such that vaccinated animals would not be an effective reservoir of the virus.

Keywords: Spanish goat encephalitis virus; goat; experimental infection; vaccination

Introduction

Louping ill is a neurological disease characterized by a primarily lymphocytic non-suppurative meningoencephalitis; it is endemic in the upland and hill farming areas of the UK and Ireland (Jeffries *et al.*, 2014). Louping ill is caused by louping ill virus (LIV), a member of the genus *Flavivirus* which belongs to the tick-borne encephalitis (TBE) group of viruses. Current taxonomy states that the LIV group is comprised of LIV isolated in the UK and Norway (four genotypes), Spanish sheep encephalitis virus (SSEV), Greek goat encephalitis virus (GGEV) and Turkish sheep encephalitis virus (TSEV) (Marin *et al.*, 1995; Gao *et al.*, 1997; Gritsun *et al.*, 2003; Grard *et al.*, 2007). Tick-borne encephalitis virus (TBE) is recognized as a separate species to LIV (Pletnev *et al.*, 2011).

In 2011, an outbreak of disease clinically and pathologically resembling louping ill occurred in a herd of Bermeya goats in Asturias (northern Spain) (Balseiro *et al.*, 2012). Whole genome sequencing and phylogenetic analysis demonstrated that the virus isolated from the brain of an affected goat was significantly divergent from LIV genotypes and SSEV. Based on those observations, the virus was identified as a novel tick-borne *Flavivirus* and the name of Spanish goat encephalitis virus (SGEV) was proposed to distinguish it from SSEV (Mansfield *et al.*, 2015). Naturally acquired infection with SGEV in the goat herd resulted in severe, acute encephalitis with a mortality rate of 100% (Balseiro *et al.*, 2012). This high mortality rate had not been reported previously in infections in sheep caused by the related LIV or SSEV, suggesting a substantial difference in pathogenesis and pathology of this isolate or greater susceptibility of goats to this, possibly host-adapted, flavivirus. Two serological surveys in the region revealed that 5.1% of goats and sheep were antibody positive by FSME (TBE) IgM enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detection kit, which recognizes any European TBE flavivirus, and 2.6% of chamois were positive by haemagglutination inhibition, which cross reacted with LIV antigen, demonstrating that exposure to flavivirus was neither common or rare (Balseiro *et al.*, 2013; Ruiz-Fons *et al.*, 2014).

The aim of this study was to determine the pathogenesis, pathology, onset and duration of SGEV RNA load in serum and the serological immune response of naïve goats challenged

experimentally with SGEV and to evaluate the efficacy in goats of the only commercially available vaccine to a flavivirus for use in animals (Louping ill BP vaccine, MSD Animal Health, Walton, UK).

Material and Method

Experimental Animals

Eighteen female Alpine goats were sourced from Castilla y León where no cases of SGEV have ever been reported. Goats were kept in isolation under tick-free conditions to avoid potential exposure to SGEV. Additionally, all animals were treated with Butox[®] (Intervet Laboratories, Carbajosa, Spain) to further prevent tick infestation. The animals arrived 2 weeks prior to vaccination, were 2 months old at the time of initial vaccination and 3 months old at the time of challenge. Goats were housed in individual boxes in level-2 biocontainment facilities and were allocated randomly into two groups of nine animals each. Sampling procedures and SGEV challenge were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Community of Junta de Castilla y León, Spain (reference number ULE_010_2015). Experiments were conducted in accordance with the current Spanish and European legal requirements and guidelines regarding experimentation and Animal Welfare.

Culture of SGEV

SGEV was isolated originally from the brain of a goat (Asturias, Spain, 2011) using ISE6 *Ixodes scapularis* tick cells cultured in L15B300 medium as described previously (Munderloh *et al.*, 1999). Subsequently, SGEV was adapted for growth, propagation and titration in baby hamster kidney (BHK-21) cells grown in Glasgow medium supplemented with 0.37% (weight/volume) sodium bicarbonate, 5% tryptose phosphate broth, 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum and antibiotics (penicillin/streptomycin solution, 100 units/ μ g per ml). The resultant virus stock had a titre of 1.4×10^8 plaque forming units (PFU)/ml in BHK-21 cells and it was diluted in BHK-21 cell tissue culture to 1.0×10^7 PFU/ml for experimental challenge in goats.

Vaccination and SGEV Challenge

One group was vaccinated with the louping ill vaccine as per the manufacturer's instructions (subcutaneous injection of 1 ml) with minor modifications. This vaccine is licensed for use in sheep and comprised of tissue culture-derived inactivated virus with a liquid paraffin/montanide adjuvant (MSD Animal Health). Although sheep require only a single dose of vaccine, it is recommended that any other species is given two doses 2 weeks apart (personal communication, H. Reid). Therefore, vaccinated goats were given two doses of vaccine subcutaneously over the right shoulder, one on day -27 and one on day -14. On day zero, the nine vaccinated and the nine unvaccinated (positive control group) goats were all challenged subcutaneously over the right thorax behind the elbow with a 1ml suspension containing 1.0×10^7 PFU/ml of SGEV.

Sampling, Serology and Evaluation of Clinical Signs

Prior to vaccination, sera from all animals were subjected to the FSME (TBE) IgM and IgG ELISAs (PROGEN[®], Heidelberg, Germany), which recognize antibodies to any European TBE flavivirus. Only animals with results below the manufacturer's designated cut-off value were used in the experiment. Blood samples were taken weekly after vaccination, then daily after challenge with SGEV from 1–8 days post challenge (dpc) and then every 2 days until sacrifice. Rectal temperature was taken on the day of challenge and then daily thereafter and clinical signs, including general condition and neurological signs were monitored daily with the severity designated as: 0, no clinical signs; 1, dullness, loss of condition, staring coat; and 2, in addition to the signs listed in 1, neurological clinical signs (e.g. tremors, ataxia or incoordination). Animals were killed at 12, 13, 21 or 28 dpc by intravenous overdose of pentobarbital (0.3 ml/kg) except for one vaccinated goat which was found dead at 4 dpc due to ruminal acidosis. Three vaccinated goats were killed at 13 dpc, two at 21 dpc and three at 28 dpc. Three goats from the positive control group were sacrificed at 12, 21 and 28 dpc.

One-step TaqMan Real-Time qRT-PCR Assay

Viral RNA was extracted from serum samples using the Speedtools RNA virus extraction kit (Biotools, Madrid, Spain), according to manufacturer's instructions, and stored at -80°C

until required. A SGEV specific quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed. Briefly, a 78 base pair (bp) fragment of the non-structural NS4b protein-coding region specific for SGEV was amplified using the primers LI-2 forward (9,199–9,221 bp) and LI-2 reverse (9,276–9,253 bp) and ‘visualized’ with the TaqMan probe Ast-LI (9,224–9,241 bp) labelled with FAM at 5’ and MGB quencher at 3’; all derived from reference to the complete genome sequence (NC_027709) of SGEV. The PCR mixture contained 12.5 µl of 2× High Scriptools-Quantimix Easy Probes Master Mix (Biotools), 100 nmol of forward and reverse primers, 250 nmol of probe, 5 µl of template RNA and RNase free water to a final volume of 25 µl. Amplification and detection were performed in a StepOne real-time PCR system (Applied Biosystems, Madrid, Spain) with the following programme: reverse transcription at 47°C for 40 min, denaturation at 95°C for 10 sec, 40 cycles at 95°C for 15 sec and 58°C for 1 min.

To validate the PCR protocol, the 78 bp fragment of the NS4b viral region obtained by PCR was cloned into pGEM T-easy cloning vector (Promega, Madrid, Spain) and transcribed *in vitro* using the MEGAScript T7 kit (Ambion, Madrid, Spain) to generate a SGEV RNA standard control plasmid. The RNA standard plasmid was diluted serially 10-fold with DEPC water from 3.14×10^9 to 3.14×10^2 RNA molecules/µl. The RT-qPCR protocol was performed using three replicates of each RNA standard plasmid dilution and the efficiency (93.3%), coefficient of correlation for the standard curve ($R^2 = 0.997$) and limit of detection (3,146 RNA copies) were obtained/estimated. No-template controls (NTCs) and SGEV RNA extracted from virus stocks were included in each assay and run as negative and positive controls, respectively. Each sample and control was tested in duplicate.

Post-mortem Examination

Goats were subjected to full necropsy examination and gross lesions were recorded. Samples for histopathology were taken from the central nervous system (CNS), extracted whole and fixed; these consisted of sections of the brain (cerebral cortical regions including the frontal, parietal and occipital lobes, optic chiasma, corpus callosum, hypothalamus, thalamus, midbrain, cerebellum, pons and medulla oblongata) and four sections of the spinal cord (cervical, thoracic, lumbar and sacral), as well as representative samples of lung, kidney,

liver, spleen, gut (distal jejunum, ileocaecal valve and associated lymph nodes), skeletal muscle (biceps brachii) and brachial and sciatic plexuses. Samples for histology were fixed in 10% neutral buffered formalin prior to trimming and selected samples were processed routinely and embedded in paraffin wax. Sections (4 μ m) from each block were stained with haematoxylin and eosin (HE).

Lesions were ascribed to one of three levels of increasing severity (Table 1): grade I, only perivascular cuffing; grade II, perivascular cuffing and small foci of glial cells; and grade III lesions were classified as moderate non-suppurative encephalomyelitis. The latter consisted of (1) perivascular cuffing formed by an infiltrate of lymphocytes and histiocytes, (2) diffuse or focal proliferation of glial cells, (3) neuronal degeneration, neuron necrosis and neuronophagia with features including satellitism, nuclear pyknosis, chromatolysis, axonal swelling, atrophy and cell lysis, (4) demyelination and vacuolation of the neuropil and (5) meningitis. Microvascular changes consisting of reactive endothelium and perivascular oedema were also present.

Semiserial sections of samples from the positive control group were subjected to immunohistochemistry (IHC) as described previously (Dagleish *et al.*, 2010) with several modifications. Briefly, sections were dewaxed in xylene prior to rehydration to 95% ethanol and endogenous tissue peroxidase activity quenched by immersion in H₂O₂ 3% in methanol (v/v) for 20 min followed by rinsing in tap water (3 \times 5 min). For antigen retrieval, slides were immersed in a 0.05% mixture of chymotrypsin and trypsin (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK) in 0.1% CaCl₂ (w/v) in 50mM Tris-HCl buffer (TBS), pH 7.8 for 10 min at 37°C. Non-specific antibody binding was blocked with 25% normal goat serum (NGS, Vector Laboratories, Peterborough, UK) in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min prior to addition of the primary mouse monoclonal anti-LIV IgG antibodies (clone 3.3, Moredun Research Institute, Edinburgh, UK raised to an envelope protein of LIV [Venugopal *et al.*, 1992] and shown to cross react with SGEV [Balseiro *et al.*, 2013; Salinas *et al.*, 2017]), diluted 1 in 3,000 in 25% NGS in PBS and incubated overnight at 4°C. Slides were washed with PBS (3 \times 5 min) and ‘visualization’ of the bound primary antibodies was by an EnVision Kit (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate, DakoCytomation, Ely, UK) as per

the manufacturer's instructions followed by addition of 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories) chromogen for 10 min. Slides were then washed with tap water, counterstained with haematoxylin for 1 min, washed in tap water again, dehydrated through graded alcohols, rinsed in xylene and mounted under DPX (Sigma-Aldrich). Negative control sections were comprised of semiserial sections of all tissues subjected to IHC with the primary antibodies substituted by isotype matched, mouse IgG antibodies and sections of known LIV-positive sheep brain were included in each run as positive controls.

Statistical Analyses

Quantitative data such as rectal temperature, SGEV RNA load and anti-European flavivirus IgM and IgG absorbance readings were tested for differences between groups and time of sampling by an analysis of variance using GLM procedure (SAS statistical package, SAS Inc., Cary, North Carolina, USA). Differences between pairs of least square means were tested with the Tukey–Kramer t-test for multiple comparisons in the same statistical package and procedure. Statistical significance was taken at $P \leq 0.05$.

Results

Clinical Findings

All of the vaccinated goats, except for the one that died suddenly of ruminal acidosis at 4 dpc, remained clinically normal throughout the study. Clinical signs were observed in unvaccinated positive control goats only. Rectal temperature began to rise at 3 dpc, peaking at 6–7 dpc. The rectal temperatures of the goats in the positive control group were significantly higher ($P < 0.0001$) than those of goats in the vaccinated group from 3–8 dpc (Fig. 1). Typically, clinical signs classified as severity 1 (primarily dullness and staring coat) affected all animals in this group and appeared at 4 dpc, which coincided with the increase in rectal temperature. Mild neurological clinical signs (severity 2), consisting of muscular tremors (primarily in the neck), ataxia and/or incoordination, affected five animals and began variably at 4 dpc (goats 81 and 86), 8 dpc (goat 85) or 10 dpc (goats 77 and 78) and persisted until sacrifice (Table 1).

Table 1. Summary of sampling times and clinical and histological lesion scores

<i>Goat ID</i>	<i>Day of necropsy examination post challenge</i>	<i>*Clinical score</i>	<i>†Histology lesion score</i>
Vaccinated goats			
90	4	0	0
88	13	0	0
93	13	0	0
95	13	0	0
97	21	0	0
99	21	0	0
94	28	0	0
98	28	0	0
100	28	0	0
Positive control goats			
76	12	1	II
79	12	1	I
86	12	2	III
77	21	2	III
81	21	2	III
80	21	1	I
78	28	2	II
82	28	1	II
85	28	2	III

*Maximum clinical signs severity score: 0, no clinical signs; 1, dullness, loss of condition and staring coat; 2, in addition to the previous clinical signs (in 1), also neurological clinical signs including tremors, ataxia and incoordination.

†Histological lesion severity score: 0, no lesions; I, perivascular cuffing; II, perivascular cuffing and small foci of gliosis; III, prominent perivascular cuffing, numerous foci of gliosis, neuronophagia, necrosis of Purkinje cells and non-suppurative meningitis.

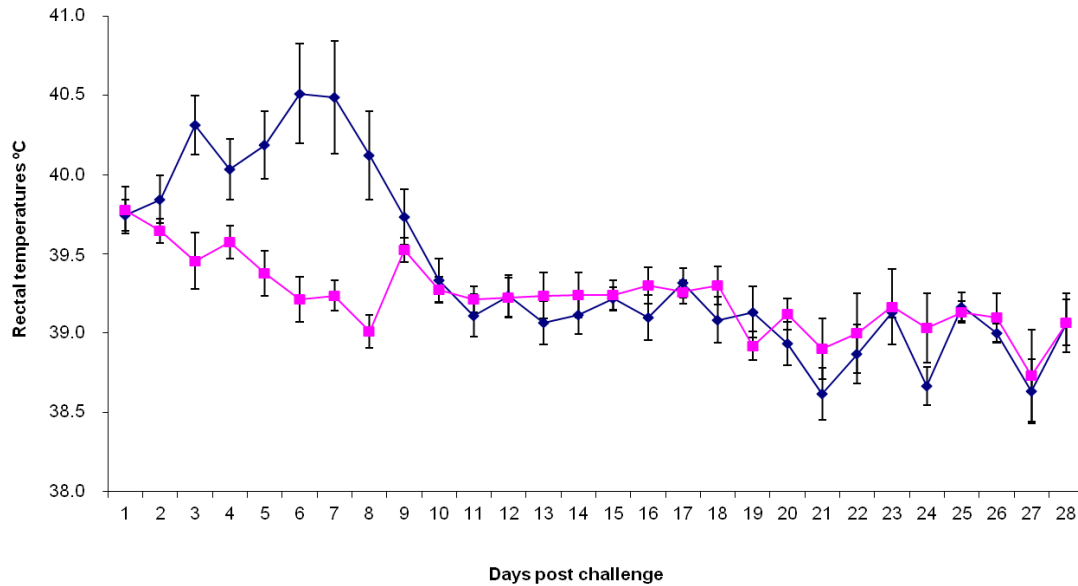


Fig. 1. Rectal temperature (mean \pm standard error of mean [SEM]) over 28 days post challenge (dpc) in positive control (blue diamonds, $n = 9$) and vaccinated (pink squares, $n = 8/9$) goats. Goats in the positive control group had significantly higher ($P < 0.0001$) rectal temperatures compared with those in the vaccinated group between 3 and 8 dpc.

Serology

Sera from all 18 goats were below the manufacturer's cut off level in the IgM and IgG ELISAs prior to the commencement of the experiment. Following vaccination at days -27 and -14, and challenge at day zero, IgM antibody concentrations remained below the manufacturer's designated cut-off value until 8–14 dpc (peaking at 10 dpc) in the vaccinated group and from 6–21 dpc (also peaking at 10 dpc) in the positive control group (Fig. 2A). The IgM concentrations in the positive control group were significantly higher ($P < 0.0001$) than in the vaccinated group from 6–21 dpc. The rise in IgM antibody concentrations coincided with the second increase in rectal temperature and was associated also with the increasing severity of clinical signs and the presence of neuropathological lesions in goats in the positive control group (Fig. 2 and Table 1).

Serum IgG concentrations in animals of the vaccinated group began to rise after the second vaccination at day -14, but did not exceed the manufacturer's cut-off value until 7 dpc and remained elevated until the animals were killed at 28 dpc (peaking at 12 dpc, Fig. 2B). In the

positive control group, the IgG concentrations did not begin to rise until 8 dpc and only exceeded the manufacturer's cut-off value at 12–21 dpc (peaking at 16 dpc) before falling below the cut-off value on the day of sacrifice at 28 dpc (Fig. 2B). The serum IgG concentrations were significantly lower ($P < 0.003$) in the positive control group compared with the vaccinated group between 4–16 dpc.

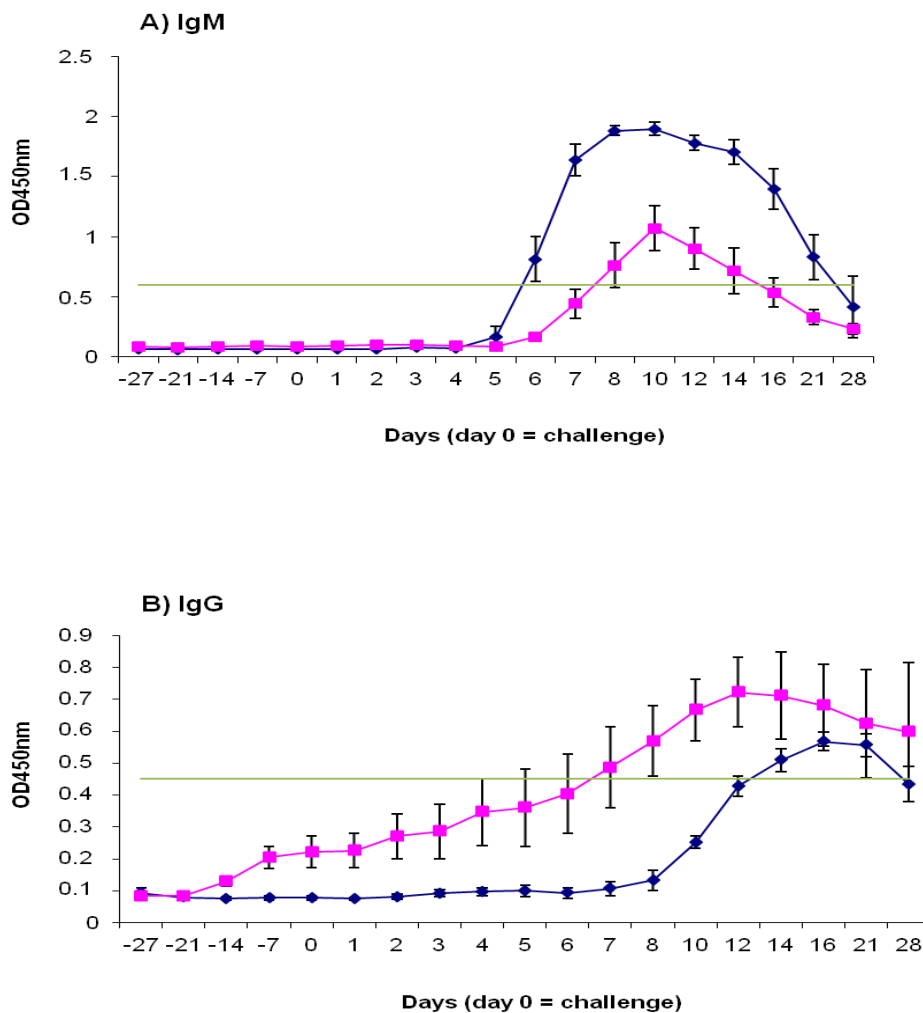


Fig. 2. Serum IgM (A) and IgG (B) concentrations in positive control (blue) and vaccinated (pink) goats. Data points correspond to the mean OD 450nm value and the error bars represent the standard error of the mean (SEM) of the group. The green line represents the manufacturer's cut off value. Significant differences were detected between groups in the IgM ($P < 0.0001$) and the IgG ($P < 0.003$) concentrations from 6 a 21 dpc and from 4 a 16 dpc, respectively.

Pathology and Immunohistochemistry

Other than congestion of meningeal vessels, which was present in animals from both groups, no gross lesions were observed in any animal. No histological lesions were found in any of the vaccinated animals (Fig. 4). Histological lesions were morphologically similar irrespective of the day of sacrifice. Goats in the positive control group showed a primarily lymphocytic non-suppurative encephalomyelitis of varying severities.

Two positive control goats had grade I lesions, three had grade II and four had grade III lesions. The right side of the brain showed more severe lesions than the left in 4/9 goats and all of these animals had grade III lesions. In goats with grade I and II lesions (5/9), there was no obvious difference in severity between different sides of the brain.

Histological lesions were consistently more severe (grade III) and multifocal in the midbrain, cerebellum, medulla oblongata and cervical spinal cord compared with other anatomical levels of the CNS (Fig. 3). The cerebral cortex typically showed grade I lesions and the thalamus, hypothalamus and hippocampus were devoid of lesions. The midbrain had perivascular cuffing, proliferation of glial cells and neuron degeneration and necrosis, mainly in the ventral aspects (Figs. 3A, 3B). Foci of gliosis were present mainly in the pons and the molecular layer of the cerebellum (Figs. 3D, 3E). Changes in the Purkinje cells varied from mild degeneration of a small number to widespread necrosis and depletion variably affecting individual cerebellar folia. In such cases there was often proliferation of Bergmann glial cells and in some instances the loss of Purkinje cells was marked by empty spaces (Fig. 3E). The medulla oblongata also showed perivascular cuffing, proliferation of glial cells and neuron degeneration and necrosis. The cervical spinal cord was consistently more severely affected than the thoracic, lumbar and sacral regions, with lesions present in both the white and grey matter. In the white matter, perivascular cuffing was usually present and in the grey matter perivascular cuffing, gliosis and neuron necrosis were present, with the ventral horns consistently more severely affected than the dorsal horns (Figs. 3G, 3H). Neuronal loss was present in several nuclei of the brain including the red, olivary, medial accessory olivary and trigeminal nuclei, plus the reticular formation and nuclei of the vagal and hypoglossal nerves.

No microscopical lesions were found in the samples of lungs, kidney, liver, spleen, gut or brachial and sciatic plexuses. No positive labelling for SGEV was found by IHC in any brain section or the brachial and sciatic plexuses from any goat in the positive control group. All negative control preparations were devoid of labelling and all positive control sections of sheep brain showed intense cytoplasmic labelling in large numbers of neurons.

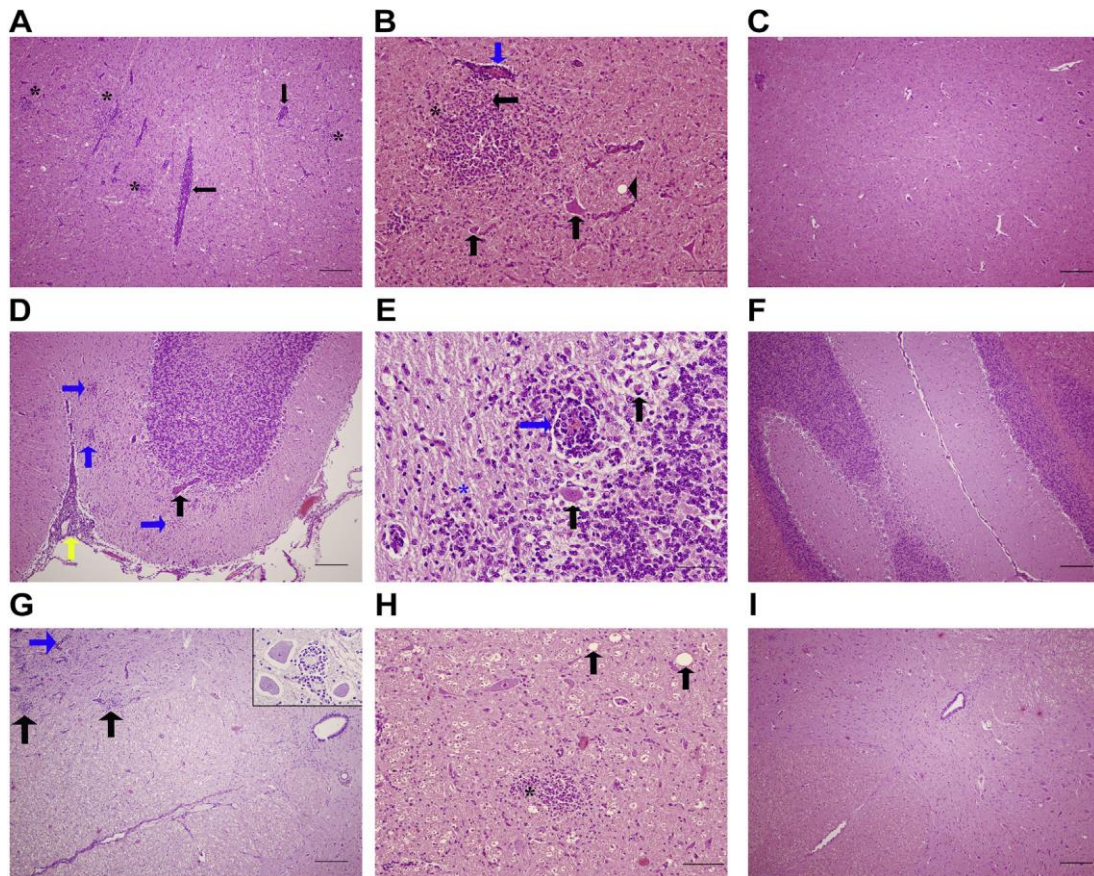


Fig. 3. Histological lesions observed in positive control (Severity III: A, B, D, E, G and H) and vaccinated goats (no lesions: C, F and J). All sections are stained by HE. (A) Midbrain: note the large number of foci of gliosis (asterisks) and perivascular cuffs (arrows). Bar, 200 μ m. (B) Midbrain: note detail of gliosis (asterisk) and perivascular cuffing (blue arrow), neuron degeneration in the red nucleus (black arrows) and vacuolation of the neuropil (arrowhead). Bar, 100 μ m. (C) Midbrain of a vaccinated goat: no histopathological changes were present. Bar, 200 μ m. (D) Cerebellum: note perivascular cuffing (black arrow) and numerous foci of gliosis (blue arrows) in the molecular layer and meningitis (yellow arrow). Bar, 200 μ m. (E) Cerebellum: note degeneration and necrosis of Purkinje cells (black arrows) and proliferation of Bergmann cells (asterisk) in the molecular layer. Perivascular cuffing was also present (blue arrow). Bar, 50 μ m. (F) Cerebellum of a vaccinated goat: no lesions were present in the molecular or granular layers or the Purkinje cells. Bar, 200 μ m. (G) Cervical spinal cord: note foci of gliosis (stars) and perivascular cuffing (asterisk) in the ventral horns. Bar, 200 μ m. Inset: note perivascular cuffing and neuron degeneration. Bar, 20 μ m. (H) Cervical spinal cord: note gliosis (asterisk) and vacuolation (black arrows) in the grey matter. Bar, 100 μ m. (I) Cervical spinal cord from a vaccinated goat: note no lesions present. Bar, 200 μ m.

SGEV RNA Load

In the positive control group, two peaks of SGEV RNA load in serum were detected, at 3 and 7 dpc, which subsequently declined at 4 and 8 dpc to reach the lowest levels at 5 and 12 dpc (Fig. 4). In the vaccinated goats, viral RNA copy numbers never varied noticeably from the limit of detection of the assay and never reached the lowest level found in the positive control group throughout the experiment. Viral RNA copy numbers in the positive control group were significantly higher ($P < 0.0001$) than in the vaccinated group at 2–10 dpc, except for at 5 dpc (Fig 4).

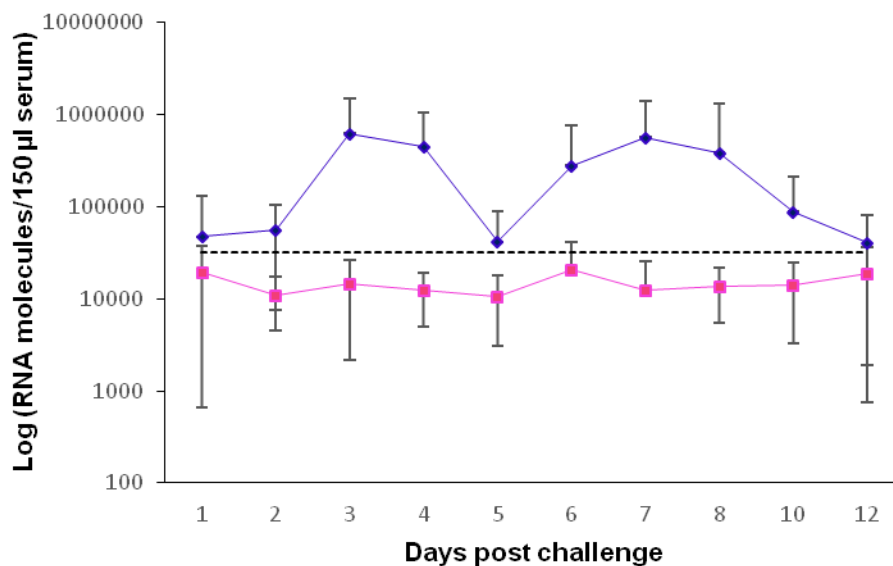


Fig. 4. SGEV RNA load in serum samples (mean + standard error of mean [SEM]) from positive control (blue) and vaccinated (pink) goats for initial 12 days post challenge with SGEV. Note that there is a biphasic rise in RNA load in positive control goats and no such rise in vaccinated animals. Viral RNA copy numbers in the positive control group were significantly higher ($P < 0.0001$) than in the vaccinated group at 2–10 dpc, except at 5 dpc. Viral RNA loads were determined by a qRT-PCR assay. A standard curve created using an RNA standard control plasmid was used for quantification. Data represent the average of eight vaccinated and nine positive control independent goats per time point. The dashed line represents the limit of detection of the assay.

Discussion

This is the first report of experimental challenge of goats with SGEV. The challenge successfully induced clinical disease and histological lesions in the CNS of the unvaccinated animals (positive control group, 100% attack rate). The commercial vaccine to LIV, which

is licensed for use in sheep only, was highly effective in protecting goats challenged experimentally by the subcutaneous route with SGEV, as no clinical disease or histological lesions were present in any of the vaccinated animals (100% efficacy). Furthermore, vaccination reduced any SGEV challenge-induced RNA load in serum to such low levels (i.e. below that of the detection limit of qRT-PCR) that transmission of the virus to feeding ticks would be prevented. This suggests that vaccination would be a highly effective method of controlling the disease in individual animals and may also reduce the prevalence of SGEV-infected *Ixodes* spp. ticks, the presumed vector of natural transmission.

Naturally acquired SGEV infection caused a 100% mortality rate in clinically affected goats (Balseiro *et al.*, 2012) and although the challenge isolate used for this study was derived from that original natural outbreak, no fatalities occurred in this study. This was despite the induction of histological lesions in the CNS in all animals in the positive control group and 5/9 of these animals developing neurological clinical signs, all of which is similar to experimental infection of sheep with LIV (Doherty and Reid, 1971a; Reid *et al.*, 1984; Sheanan *et al.*, 2002). This difference in mortality rate between the naturally acquired and experimentally induced disease may be due to a number of factors. The initial outbreak of SGEV occurred in Bermeya goats (Balseiro *et al.*, 2012), a rare breed in danger of extinction that are consequently highly inbred and probably have a restricted genetic diversity. The herd had been translocated to an area previously devoid of this breed and it is unlikely they had been exposed previously to the virus prior to this. Furthermore, if the Bermeya goats had not been exposed to ticks previously, they may have had a combined infection of SGEV and anaplasmosis which has been shown to increase dramatically the mortality rate of flavivirus infection (Reid *et al.*, 1986). Additionally, the differences in mortality rate may be due to the challenge dose, the route of inoculation, the individual immunocompetence and general condition of the animals and/or the loss of virulence of the original viral strain after culture in tick and mammalian cell lines, plus laboratory manipulation (Reid *et al.*, 1984, Sheanan *et al.*, 2002). However, considering the severity of the lesions in the brain, which were similar to those in naturally infected goats (Balseiro *et al.*, 2012); it is unlikely that the virus had become significantly less pathogenic. As SGEV is thought to be transmitted by ticks, the route of challenge is also unlikely to have affected the mortality rate. The most likely reasons

for the lack of mortality in the experimentally challenged animals is the different breed of goat used and the low-stress environment of the experimental facilities, which remove all nutritional, climatic, production and predator-associated stress. This is analogous to subcutaneous experimental challenge with LIV in sheep and goats at a similar dose ($2.5 \times 10^6 - 10^{6.6}$ PFU/animal), where only 2/8 sheep and 1/7 goats developed neurological clinical signs (Reid and Doherty, 1971; Reid *et al.*, 1984). The much higher proportion (5/9) of goats developing neurological clinical signs in this study suggests that SGEV may be more pathogenic than LIV. The pathogenicity of SGEV in sheep has been studied and is described elsewhere (Salinas *et al.*, 2017). Furthermore, as SGEV was described relatively recently, it is unknown if goats are truly the natural host or if they are a spill-over from another species, such as the sympatric chamois (*Rupicapra* spp.) (Ruiz-Fons *et al.*, 2014). Sheep and goats have different susceptibilities to various diseases (e.g. bluetongue; Maclachlan *et al.*, 2009) and differences in the individual immune response of each species should be taken into account. Experimental infection of lambs with LIV results in neurological clinical signs 8–13 dpc (Reid and Doherty, 1971; Sheanan *et al.*, 2002), but in goats, pyrexia, which correlates with viraemia, occurs at 3–10 dpc, followed by the appearance of neurological clinical signs, such as tremors, at 12 and 13 dpc. (Reid *et al.*, 1984). Our findings showed initial clinical signs, such as pyrexia and depression, began at 3 dpc, coinciding with the initial peak of RNA load (also at 3 dpc), but with onset of neurological clinical signs later (i.e. at 10 dpc), which suggests that goats have a shorter incubation period when challenged with SGEV compared with LIV (Reid *et al.*, 1984).

In the present study, the three goats with the most severe pyrexia (between 41.5–42°C) developed the most severe histological lesions (grade III). Animals with moderate or severe histological lesions (grades II and III) also developed neurological clinical signs and had higher SGEV RNA loads compared with those with mild histological lesions (grade I). This is similar to other encephalitic viruses, as the initial viral load in serum after infection and the control of early viraemia are two important factors in the development of encephalitis (Prow *et al.*, 2014; de Wispelaere *et al.*, 2015). The severity of clinical signs in louping ill has been directly related to the extent of damage to neurons (Doherty and Reid, 1971a; Sheanan *et al.*, 2002), with neuropathological changes in moribund sheep most marked in the

Purkinje cells, the neurons of the motor and vestibular nuclei and ventral horns of the spinal cord (Doherty and Reid, 1971a). This is similar to the locations of the lesions caused by SGEV in this study which suggests that the virus has the same neurotropic characteristics as LIV.

The distribution of lesions in the spinal cord has not been studied previously in detail (Doherty and Reid, 1971b). In the present study, lesions were found throughout the spinal cord, but the most severe and extensive lesions were consistently in the cervical spinal cord, which may explain why tremors in the neck were the most common clinical sign. The lack of any immunolabelling in the CNS and brachial plexuses, despite high levels of virus, suggests either that the virus had disappeared previous to the day of sacrifice after the initial rise of RNA load in serum, and/or that any virus present was bound by challenge-induced endogenous antibody, which blocked the specific epitope recognized by the anti-LIV monoclonal antibody.

The mechanism of translocation in natural LIV infections, and other tick-borne encephalidies, from the site of the infected tick-bite to the CNS is thought to be haematogenous during the phase of viraemia after initial viral replication in the lymphoid tissues (Reid and Chianini, 2007). The ipsilateral nature of the CNS lesions in relation to the site of challenge with SGEV, although suggestive of a neurotropic rather than a haematogenous spread from the point of inoculation, it is too short a time course for this to have occurred. The goats in this study were devoid of lesions in the thalamus and hippocampus, which is in contrast to lesions found in lambs challenged experimentally with LIV by the subcutaneous route (Doherty and Reid, 1971b; Sheanan *et al.*, 2002), but we cannot explain this observation.

Vaccination of goats with the LIV vaccine failed to induce a detectable IgM response despite the application of two doses of vaccine given 2 weeks apart. Furthermore, vaccination appears to have both delayed and reduced the IgM response to challenge with live SGEV, as the unvaccinated positive control animals reacted more quickly, with a significantly greater concentration of IgM, which was also of longer duration. The initial lack of an observed IgM

response to vaccination may be due to the difficulty in measuring low concentrations of this antibody due to its pentameric nature, which reduces the accessibility of surface epitopes for binding by other antibodies. Alternatively, the sensitivity of the ELISA may be low as it was not developed specifically to detect goat antibodies to SGEV and there may be low cross-reactivity. However previous studies have demonstrated cross-reactivity with LIV (Klaus *et al.*, 2014), so it is not unreasonable to assume cross-reactivity with SGEV. In the vaccinated group, the lower concentration of IgM found in response to challenge with SGEV was probably due to the presence of vaccine-induced IgG binding rapidly to the virus, thereby negating the induction of a large or rapid IgM response.

IgG concentrations increased in the LIV-vaccinated group after the initial dose and continued to increase steadily after the second vaccine dose and the challenge with live SGEV, such that IgG antibodies were notably and significantly higher in concentration throughout the whole experiment. This would suggest that the LIV vaccine induced an IgG response and that the resultant 100% efficacy of the vaccine shows that this antibody cross reacts with SGEV and that IgG levels present prior to challenge were probably critical for the protection conferred. Conversely, the rising IgM concentrations in the non-vaccinated animals did not protect them from disease, nor did the lower and later developing IgG antibodies, despite the rapid decrease in viral load at 10 dpc, which coincided with peak IgM concentrations. This suggests that IgM would be not be as efficient at clearing the RNA load or that the concentrations induced over this timescale were not high enough to contribute to protection.

The reduction in the viral RNA load observed in the positive control group following the appearance of the humoral immune response was probably due to the major role that neutralizing antibodies play in clearing viraemia in infected animals (Diamond *et al.*, 2003). Serological tests are very useful for evaluating the epidemiological status of herds. In the UK, where louping ill is endemic, the presence of IgM antibodies to LIV is used as an indicator of a recent infection (Reid and Chianini, 2007). Our findings indicate that, when using the IgM ELISA in goats, it would be possible to detect recently-infected animals between 6–15 days post infection, a very short time interval and then only if natural infection

mimics our experimental challenge (Fig. 1). However, under field conditions and in a large population, natural infections would not occur simultaneously and this would broaden the window of usefulness of the IgM ELISA.

The initial increase in SGEV RNA load seen in the positive control group between 2–5 dpc, and peaking at 3 dpc, probably represents the primary viral replication in lymphoid tissues resulting in infectious virus spreading to the CNS via the haematogenous route. This initial rise in RNA load would be the one that infects co-feeding larvae, nymphs and ticks for persistence of the disease in the environment. The second rise in blood-borne virus seen 5–10 dpc and peaking at 7 dpc probably denotes secondary replication within the CNS. The virus released from this secondary replication in the CNS into the cerebrospinal fluid and thence to the blood was probably less infectious, as it would have been highly antibody associated, especially with IgM. Therefore, for diagnostic purposes in endemic areas, a combination of selective blood sampling of pyrexemic animals to evaluate IgM and/or viral load should be used to indicate recent infection with SGEV. Conversely, evaluation of serum IgG concentrations would be useful for evaluating the level of exposure of a population, as well as assessing the response to vaccination.

At present there is no treatment, other than symptomatic, for louping ill and control of the disease relies on vaccination or control of the tick vector (Jeffries *et al.*, 2014). The present study showed that vaccination of goats against LIV conferred highly effective protection against SGEV-induced histological lesions and clinical disease, which was probably IgG dependent, and that vaccination is a viable option for control of the disease. However, this study did not determine the duration of immunity to SGEV conferred by the LIV vaccine and future work should address this and also establish the optimal age and vaccination schedule, including whether one dose of vaccine would be effective.

Acknowledgments

We thank C. Pérez Martínez (University of León), R. González (SERIDA), C. Underwood and V. Forbes (Moredun Research Institute) for technical support. We also thank U. Munderloh (University of Minnesota) for providing the ISE6 *I. scapularis* tick cells. This work was supported by a grant from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria

y Alimentaria (INIA), reference number E-RTA2013-00013-C04-04 (FEDER co-funded) and the Rural and Environment Science and Analytical Services (RESAS) division of the Scottish Government.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest with respect to publication of this manuscript.

References

- Balseiro A, Royo LJ, Pérez Martínez C, Fernández de Mera IG, Höfle U *et al.* (2012) Louping ill in goats, Spain, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, **18**, 976-978.
- Balseiro A, Royo LJ, Pérez C, Copano MF, Rubio T *et al.* (2013) Louping ill in goats in northern Spain: more than a forgotten disease. *Journal of Comparative Pathology*, **148**, 51.
- Dagleish MP, Benavides J, Chianini F (2010) Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research*, **92**, 19-35.
- de Wispelaere M, Frenkiel MP, Desprès P (2015) A Japanese encephalitis virus genotype 5 molecular clone is highly neuropathogenic in a mouse model: impact of the structural protein region on virulence. *Journal of Virology*, **89**, 5862-5875.
- Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M (2003) B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *Journal of Virology*, **77**, 2578-2586.
- Doherty PC, Reid HW (1971a) Experimental louping-ill in sheep and lambs. II. Neuropathology. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 331-337.
- Doherty PC, Reid HW (1971b) Louping ill encephalomyelitis in the sheep: II. Distribution of virus and lesions in nervous tissue. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 531-536.
- Gao GF, Zanutto PM, Holmes EC, Reid HW, Gould EA (1997) Molecular variation, evolution and geographical distribution of louping ill virus. *Acta Virologica*, **41**, 259-268.

- Grard G, Moureau G, Charrel R, Lemasson JJ, González JP *et al.* (2007) Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenic determinants and taxonomy. *Virology*, **361**, 80-92.
- Gritsun T, Lashkevich V, Gould E (2003) Tick-borne encephalitis. *Antiviral Research*, **57**, 129-146.
- Jeffries CL, Mansfield KL, Phipps LP, Wakeley PR, Mears R *et al.* (2014) Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. *Journal of General Virology*, **95**, 1005-1014.
- Klaus C, Ziegler U, Kalthoff D, Hoffmann B, Beer M (2014) Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *BMC Veterinary Research*, **10**, 78.
- Maclachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G (2009) The pathology and pathogenesis of bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*, **141**, 1-16.
- Mansfield KL, Balseiro A, Johnson N, Ayllón N, Höfle U *et al.* (2015) Identification and characterization of a novel tick-borne flavivirus subtype in goats (*Capra hircus*) in Spain. *Journal of General Virology*, **96**, 1676-1681.
- Marin MS, McKenzie J, Gao GF, Reid HW, Antaniadis A *et al.* (1995) The virus causing encephalomyelitis in sheep in Spain: a new member of the tick-borne encephalitis group. *Research in Veterinary Science*, **58**, 11-13.
- Munderloh UG, Jauron SD, Fingerle V, Leitritz L, Hayes SF *et al.* (1999) Invasion and intracellular development of the human granulocytic ehrlichiosis agent in tick cell culture. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**, 2518-2524.
- Pletnev A, Gould E, Heinz FX, Meyers G, Thiel HJ *et al.* (2011) Family: Flaviviridae. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. AMQ King, MJ Adams, EB Carstens, EJ Lefkowitz Eds., Elsevier, Oxford, pp. 1003-1010.
- Prow NA, Setoh YX, Biron RM, Sester DP, Kim KS *et al.* (2014) The West Nile virus-like Flavivirus Koutango is highly virulent in mice due to delayed viral clearance and the induction of a poor neutralizing antibody response. *Journal of Virology*, **88**, 9947-9962.
- Reid HW, Doherty PC (1971) Experimental louping-ill in sheep and lambs. I. Viraemia and the antibody response. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 291-298.

- Reid HW, Buxton D, Pow I, Finlayson J (1984) Transmission of louping-ill virus in goat milk. *Veterinary Record*, **114**, 163-165.
- Reid HW, Buxton D, Pow I, Brodie Ta, Holmes PH *et al.*, (1986) Response of sheep to experimental concurrent infection with tick-borne fever (*Cytoecetes-phagocytophila*) and louping-ill virus. *Research in Veterinary Science*, **41**, 56-62.
- Reid HW, Chianini F (2007) Louping ill. In: *Disease in sheep*. ID Aitken, Ed., Blackwell, Oxford, pp. 250-255.
- Ruiz-Fons F, Balseiro A, Willoughby K, Oleaga A, Dagleish MP *et al.* (2014) Clinical infection of Cantabrian chamois (*Rupicapra pirenaica parva*) by louping ill virus: new concern for mountain ungulate conservation? *European Journal of Wildlife Research*, **60**, 691-694.
- Salinas LM, Casais R, García Marín JF, Dalton KP, Royo LJ *et al.* (2017) Lambs are susceptible to experimental challenge with Spanish goat encephalitis virus. *Journal of Comparative Pathology*, in press.
- Sheahan BJ, Moore M, Atkins GJ (2002) The pathogenicity of louping ill virus for mice and lambs. *Journal of Comparative Pathology*, **126**, 137-146.
- Venugopal K, Buckley A, Reid HW, Gould EA (1992) Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows close homology to louping ill virus.



EXPERIMENTALLY INDUCED DISEASE

2. Trabajo #2. Lambs are Susceptible to Experimental Challenge with Spanish Goat Encephalitis Virus

**L. M. Salinas^{*}, R. Casais[†], J. F. García Marín^{*}, K. P. Dalton[‡], L. J. Royo[†],
A. del Cerro[†], E. Gayo^{*}, M. P. Dagleish[§], R. A. Juste[†] and A. Balseiro[†]**

^{}Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, [†]SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Centro de Biotecnología Animal, Gijón, Asturias, [‡]Instituto Universitario de Biotecnología de Asturias, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Oviedo, Campus El Cristo, Oviedo, Asturias, Spain and [§]Moredun Research Institute, Pentlands Science Park, Bush Loan, Penicuik, Near Edinburgh, Scotland, UK*

Summary

Spanish goat encephalitis virus (SGEV) is a member of the genus *Flavivirus*, family Flaviviridae, and causes encephalomyelitis in goats. The aim of this study was to determine whether sheep are susceptible to experimental challenge with SGEV by two different routes. The results show that SGEV can infect sheep by both the subcutaneous and intravenous routes, resulting in neurological clinical disease with extensive and severe histological lesions in the central nervous system. Lambs challenged subcutaneously developed more severe lesions on the ipsilateral side of the brain, but the lesion morphology was similar irrespective of the route of challenge. The clinical presentation, pathogenesis, lesion morphology and distribution shows that SGEV is very similar to louping ill virus (LIV) and therefore any disease control plan must take into account any host species and SGEV vectors as potential reservoirs. Furthermore, discriminatory diagnostics need to be applied to any sheep or goat suspected of disease due to any flavivirus in areas where SGEV and LIV co-exist.

Keywords: Spanish goat encephalitis virus; lamb; experimental infection; immunology; pathology.

Introduction

Spanish goat encephalitis virus (SGEV) is a member of the genus *Flavivirus*, family Flaviviridae (Mansfield *et al.*, 2015), and causes encephalomyelitis in goats (Balseiro *et al.*, 2012); however, it is still uncertain if goats are the primary host. Whole genome comparison showed that SGEV shares 89.4% homology with Spanish sheep encephalitis virus (SSEV) and between 88.7–89.3% homology with three louping ill virus (LIV) isolates (Mansfield *et al.*, 2015). All three viruses (SGEV, SSEV and LIV) are members of the tick-borne flavivirus lineage and SGEV is considered to be a subspecies within the louping ill species of tick-borne flaviviruses. LIV is endemic in upland areas of the UK where sheep and red grouse are considered to be the reservoir (Jeffries *et al.*, 2014). The commercially available vaccine to protect sheep against LIV (Louping ill BP vaccine, MSD Animal Health, Walton, Milton Keynes, UK) has been shown to protect goats against experimental challenge with SGEV (Salinas *et al.*, 2017), but it is unknown if sheep are susceptible to infection with SGEV.

The aims of this study were: (1) to determine whether sheep are susceptible to experimental challenge with SGEV, by two different routes, and describe any resultant viraemia, pathogenesis and immune response, and (2) to compare these parameters with a previously reported SGEV experimental challenge of goats (Salinas *et al.*, 2017).

Material and method

Experimental Animals

Twenty-two female lambs (Assaf breed) were sourced from Castilla y León, where no cases of SGEV have ever been reported. The lambs were raised in isolation under tick-free conditions in order to avoid potential exposure to SGEV or any other tick-borne virus, treated preventively with Butox[®] (Intervet Laboratories, Carbajosa, Spain) to further prevent the possibility of tick infestation and subsequently housed in bio-containment level 2 facilities. Once in the experimental facilities, the animals were allocated randomly to one of three separately housed groups; two groups of nine lambs and a further group of four; the latter were used as negative controls. Sampling and challenge procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Community of Junta de Castilla y León, Spain (reference number ULE_010_2015). Experiments were conducted in accordance with the

current Spanish and European legal requirements and guidelines regarding experimentation and animal welfare.

Culture of SGEV and Experimental Challenge

SGEV was grown in cell culture and titrated as described elsewhere (Salinas *et al.*, 2017). Briefly, SGEV was adapted for growth in baby hamster kidney (BHK)-21 cells. BHK-21 cells were grown in Glasgow medium supplemented with 0.37% (weight/volume) sodium bicarbonate, 5% tryptose phosphate broth, 2 mM L-glutamine, 10% fetal calf serum and antibiotics, and used for the propagation and titration of SGEV.

The virus stock had a titre of 1.4×10^8 plaque forming units (PFU)/ml in BHK-21 cells and it was diluted in BHK-21 cell culture to 1.0×10^7 PFU/ml for experimental challenge in lambs.

One group ($n = 9$, group SC) was challenged subcutaneously on the right thorax caudal to the elbow with 1 ml of a suspension containing 1.0×10^7 PFU/ml in BHK-21 cells. A second group ($n = 9$, group IV) was challenged intravenously via the jugular vein with an identical dose. The remaining group ($n = 4$) were un-challenged negative controls.

Serum Sampling, Serology and Evaluation of Clinical Signs

Prior to challenge all animals were tested using the FSME tick-borne encephalitis (TBE) IgM and IgG enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) (PROGEN[®], Heidelberg, Germany), which recognize antibodies to any TBE due to flaviviruses, including LIV (Klaus *et al.*, 2014), to confirm the absence of previous exposure to any European TBE flavivirus. Blood samples, for harvesting serum, were taken from the jugular vein on the day of challenge, daily for 8 days post challenge (dpc) and then every 3 dpc until sacrifice. Blood samples were centrifuged at 240 g for 5 min, the sera removed and stored at -80°C until examined for IgM and IgG levels by ELISA as described above. Rectal temperatures were taken prior to challenge and at intervals of 24 hours post challenge (hpc) and clinical signs, including general condition and neurological signs, were monitored daily with the severity designated as: 0, no clinical signs; 1, dullness, loss of condition and staring coat; 2, in addition to changes for a score of (1), neurological clinical signs (e.g. tremors, ataxia or

incoordination). The experiment was terminated at 12 or 17 dpc by intravenous overdose of pentobarbital (0.3 ml/kg) (Table 9).

Table 1. Clinical signs and histopathological lesion scores

<i>Lamb ID</i>	<i>Day of necropsy post challenge</i>	<i>*Severity of clinical signs (day of onset)</i>	<i>†Severity of histological lesions</i>
Subcutaneous route			
14	12	0	III
18	17	1 (4)	IV
19	12	2 (4)	I
21	12	0	III
25	17	0	III
26	12	0	III
28	17	2 (12)	IV
29	17	2 (9)	III
50	17	0	0
Intravenous route			
00	17	0	III
01	12	2 (4)	III
05	12	0	III
15	12	2 (2)	IV
16	17	2 (3)	III
22	17	2 (13)	I
24	12	0	I
30	17	2 (8)	IV
32	17	2 (3)	III

*Neurological clinical signs: 0, none; 1, dullness, loss of condition and staring coat; 2, in addition to the previous clinical signs (in 1), neurological clinical signs such as tremors, ataxia and incoordination.

†Histological lesion score: 0, none; I, very mild with only perivascular cuffing; II, mild with perivascular cuffing and a small number of glial foci; III, moderate with numerous perivascular cuffs, numerous glial foci, neuronophagia, necrosis of Purkinje cells and meningitis; IV, severe with frequent perivascular cuffing, diffuse gliosis and neuron necrosis.

Real-time Reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction

Serum samples were subjected to specific TaqMan quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) to determine the presence and absence, and also the relative amount, of SGEV present as described previously (Salinas *et al.*, 2017). No-template controls (NTCs) and SGEV RNA extracted from cultured virus stocks were included in each assay as negative and positive controls, respectively. Each sample and control was tested in duplicate.

Post-mortem Examination and Immunohistochemistry

Lambs were subjected to full necropsy examination and gross lesions were recorded. Samples for histological examination were taken from the central nervous system (CNS) and consisted of sections of the brain (cerebral cortical regions including frontal, parietal and occipital lobes; optic chiasma, corpus callosum, hypothalamus, thalamus, midbrain, cerebellum, pons and medulla oblongata) and four sections of the spinal cord, one each from a different anatomical level (i.e. cervical, thoracic, lumbar and sacral), as well as representative samples of lung, kidney, liver, spleen, gut (distal jejunum, ileocaecal valve and associated lymph nodes), skeletal muscle (biceps brachii) and brachial and sciatic plexuses. Samples for histology were placed in 10% neutral buffered formalin prior to trimming and chosen samples were processed routinely through graded alcohols and embedded in paraffin wax. Sections (4 μ m) from each block were stained with haematoxylin and eosin (HE). Lesions were ascribed to one of four levels of increasing severity (Table 1): grade I, only perivascular cuffing present; grade II, perivascular cuffing and a small number of foci of glial cells present; or grade III, moderate non-suppurative encephalomyelitis. The latter consisted of (1) perivascular cuffing formed by an infiltrate of lymphocytes and histiocytes, (2) diffuse or focal proliferation of glial cells, (3) neuronal degeneration, neuron necrosis and neuronophagia with features including satellitism, nuclear pyknosis, chromatolysis, axonal swelling, atrophy and cell lysis, (4) demyelination and vacuolation of the neuropil, and (5) meningitis. Microvascular changes consisting of reactive endothelium and perivascular or edema were also present. Finally, grade IV, severe generalized non-suppurative encephalomyelitis also comprised of those changes listed for grade III.

Semiserial sections from the CNS samples and plexuses were subjected to immunohistochemistry (IHC) as described previously (Dagleish *et al.*, 2010) with several modifications. Briefly, sections were dewaxed in xylene prior to rehydration to 95% ethanol and endogenous tissue peroxidase activity was quenched by immersion in H₂O₂ 3% in methanol (v/v) for 20 min followed by rinsing in tap water (3 × 5 min). For antigen retrieval, slides were immersed in a 0.05% mixture of chymotrypsin and trypsin (Sigma-Aldrich Company Ltd., Gillingham, UK) in 0.1% CaCl₂ (w/v) in 50mM Tris-HCl buffer (TBS), pH 7.8 for 10 min at 37°C. Non-specific antibody binding was blocked with 25% normal goat serum (NGS, Vector Laboratories, Peterborough, UK) in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min prior to addition of the primary mouse monoclonal anti-LIV IgG antibodies (clone 3.3, Moredun Research Institute, Edinburgh, UK raised to an envelope protein of LIV [Venugopal *et al.*, 1992]), diluted 1 in 3,000 in 25% NGS in PBS and incubated overnight at 4°C. Slides were washed with PBS (3 × 5 min) and ‘visualization’ of the bound primary antibodies was by EnVision Kit (goat anti-mouse horseradish peroxidase conjugate, DakoCytomation, Ely, UK) as per the manufacturer’s instructions followed by addition of 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Vector Laboratories) chromogen for 10 min. Slides were then washed with tap water, counterstained with haematoxylin for 1 min, washed in tap water again, dehydrated through graded alcohols, rinsed in xylene and mounted in DPX (Sigma-Aldrich Company Ltd., Poole, United Kingdom). Negative control sections were comprised of semiserial sections of all tissues examined by IHC with the primary antibodies substituted by isotype-matched mouse IgG antibodies and sections of known LIV-positive sheep brain were included in each run as positive controls.

Statistical Analyses

Quantitative data such as rectal temperature, RNA load and anti-European flavivirus IgG and IgM optical density readings were tested for differences between groups and time of sampling by analysis of variance using the GLM procedure (SAS statistical package, SAS Inc., Cary, North Carolina, USA). Differences between pairs of least square means were tested with the Tukey–Kramer t-test for multiple comparisons in the same statistical package. A Pearson correlation analysis was applied to the quantitative variables of rectal temperature,

SGEV RNA load, IgG and IgM in order to determine their associations. Statistical significance was taken as $P \leq 0.05$.

Results

Clinical Findings

All four animals in the negative control group were devoid of any clinical signs and showed no deviation from normal rectal temperature range throughout the study. No animal from any of the three groups died during the experiment. Rectal temperature began to rise at 3 dpc in group SC and on day 2 in group IV (Fig. 1). Pyrexia was greater in group IV than in group SC although the difference between the groups was not significant ($P = 0.074$). Daily variation in rectal temperature within group IV animals showed that it was significantly higher ($P < 0.0001$) at 4 dpc compared with 0, 1, 14 and 16 dpc. No significant differences in rectal temperature between different days were observed within group SC animals throughout the duration of pyrexia. Typically, clinical signs reached severity 1 (i.e. dullness, loss of condition and staring coat) at 4 dpc in group SC and at 2 dpc in group IV, similar to the commencement of pyrexia. Mild neurological clinical signs (severity score 2) consisting of muscular tremors, mainly located in the neck, ataxia and/or incoordination were observed in 3/9 lambs in group SC and in 6/9 lambs in group IV. Neurological clinical signs began on different days depending on the individual lamb (Table 1) and, once present, remained for the duration of the experiment until sacrifice.

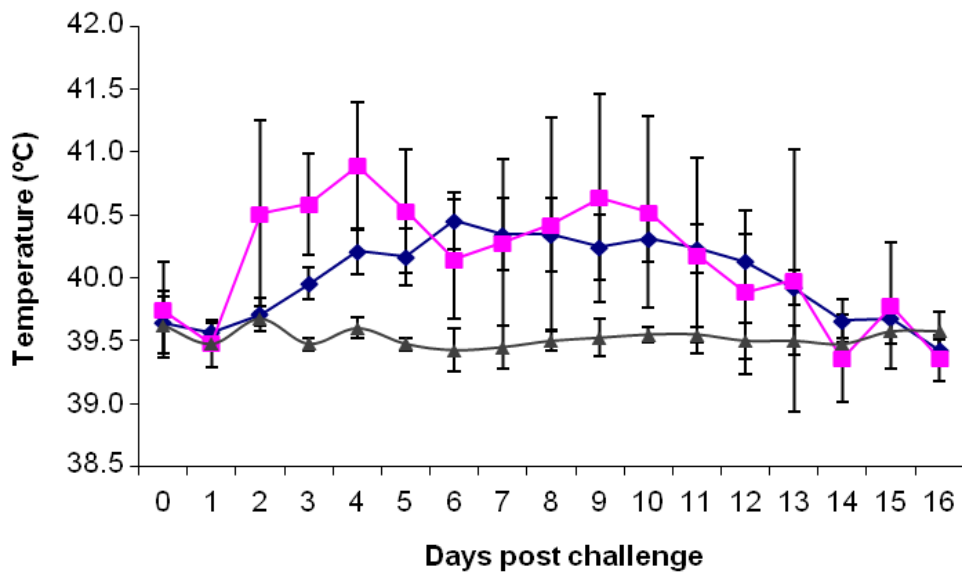


Fig. 1. Rectal temperature of lambs after SGEV experimental challenge by subcutaneous (blue diamonds), intravenous (pink squares) routes or unchallenged negative controls (black triangles). Data points represent the mean temperature value and the error bars represent the standard error of mean (SEM) of the group. Rectal temperature of a healthy lamb was considered to be 39.1–39.8°C.

Serological Studies

Sera from all 22 lambs were below the manufacturer’s cut-off levels in the IgM and IgG ELISAs prior to the commencement of the experiment. Different kinetics of the serum IgM response to challenge with SGEV were observed between groups SC and IV (Fig. 2). Initial increase in the IgM levels was present in group IV from 6 dpc, peaking at 8 dpc and decreasing afterwards. In group SC, the IgM response was slower; a slight increase was observed from 6–7 dpc, which peaked at 11 dpc and subsequently decreased afterwards (Fig. 7). The IgM levels in group IV were significantly higher ($P < 0.0001$) compared with group SC on 7 and 8 dpc only.

Serum IgG responses were first detected 3 days after the appearance of IgM antibodies and the kinetics were similar in both groups (Fig. 2). However, the IgG levels in group IV were significantly higher ($P < 0.0001$) than those in group SC from 11–18 dpc. The IgG and IgM titres in the non-challenged negative control group remained below the manufacturer’s designated cut-off levels throughout the experiment.

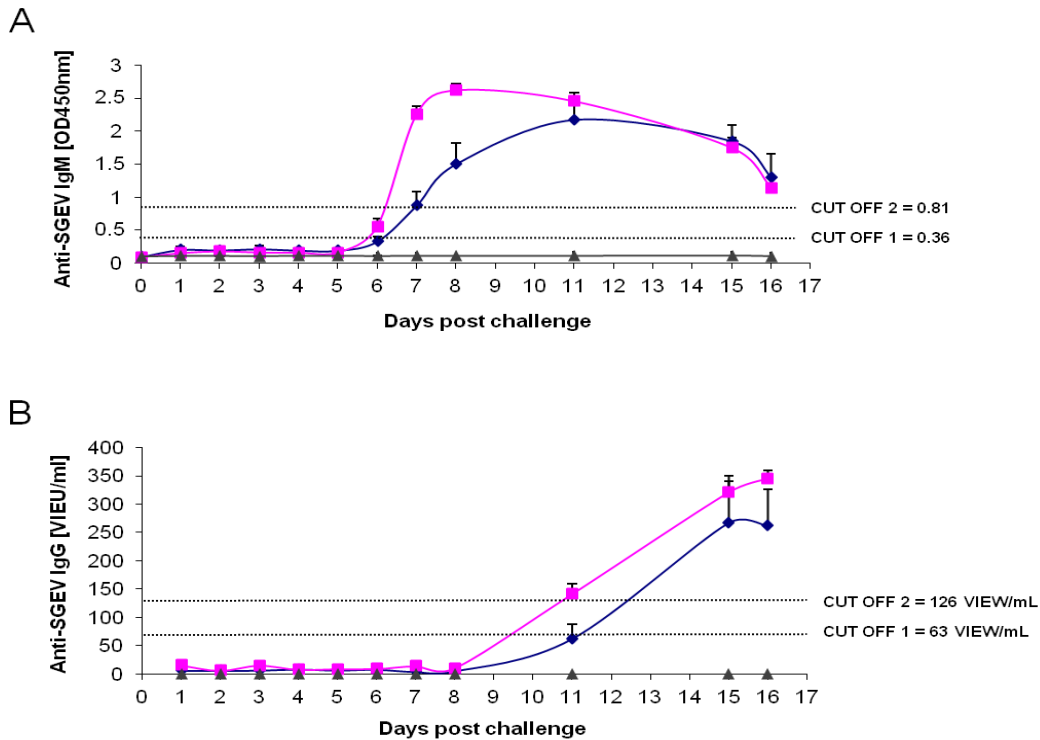


Fig. 2. Circulating serum IgM (A) and IgG (B) antibody levels in lambs challenged experimentally with SGEV by subcutaneous (blue diamonds), intravenous (pink squares) routes or unchallenged negative controls (black triangles). IgM and IgG levels were detected using commercial ELISAs (FSME TBE IgM and ‘all species’ IgG kits). Data points for IgM and IgG correspond to the mean OD 450nm value and Vienna units (VIEW)/ml, respectively. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Dashed lines represent ‘definitive negative’ below cut off 1, ‘definitive positive’ above cut off 2, and ‘inconclusive’ between cut off lines 1 and 2.

Pathology and Immunohistochemistry

Other than congestion of meningeal vessels, which was present in animals of all three groups and presumed to be due to the method of humane destruction, no gross lesions were observed in any animal. No histological lesions were observed in the negative control animals. Histologically, lambs from groups SC and IV showed non-suppurative meningoencephalomyelitis in both the grey and white matter (Fig. 3) with severities of grade III (5/9 each group) and grade IV (2/9 each group) most frequently present (Table 1). Group SC lambs with the higher grade scores had lesions more frequently on the ipsilateral side to that of the SGEV challenge. This lesion distribution was not present in group IV lambs. Histological lesions were consistently more frequent and more severe in the midbrain,

cerebellum and medulla oblongata (Fig. 3A) and all sections of the spinal cord compared with the more rostral anatomical levels of the CNS examined. The cerebral cortex usually showed a maximum of grade II lesions, which were present in both white and grey matter, although mainly in the former. The thalamus, hypothalamus and hippocampus had similar lower grade lesions.

In the cerebellum, foci of gliosis (Fig. 3B) were present primarily in the molecular layer of the folia. Changes in the Purkinje cells varied from mild degeneration of a few cells to widespread necrosis and depletion variably affecting different cerebellar folia. In these cases there was often proliferation of Bergmann glial cells and in some instances the loss of Purkinje cells was marked by empty spaces (Fig. 3C). The brainstem contained perivascular cuffing, proliferation of glial cells and neuron degeneration and necrosis, mainly in the ventral regions. Loss of neurons was observed in several nuclei in the brain including the olivary, medial accessory olivary and rostral trigeminal (Fig. 3D), accessory cuneate, reticular formation and nuclei of the vagal and hypoglossal nerves. In the spinal cord, lesions were present in both white and grey matter (Figs. 3E, 3F). In the white matter, perivascular cuffing was usually present with only occasional glial foci. In the grey matter, the ventral horns were more affected than the dorsal horns and showed perivascular cuffing, gliosis and neuron necrosis. All levels of the spinal cord were similarly affected. No lesions were found in any of the samples of lung, kidney, liver, spleen, gut, lymph nodes or brachial and sciatic plexuses examined. No differences in morphology or severity were observed based on the day of sacrifice.

No extensive positive labelling for SGEV was found by IHC in any brain section or in the brachial and sciatic plexuses from any animal in the study. Two animals (ID 26 and 28) from group SC had weak labelling; one (ID 26) had extracellular labelling in the centre of a glial focus in the ventral pons (Fig. 4A) and the other (ID 28) had a low to medium amount of intracytoplasmic punctate labelling in a very small number of neurons in the pons and medulla oblongata (Fig. 4C). All negative control preparations were devoid of labelling and all positive control sections of sheep brain showed intense cytoplasmic labelling in many neurons.

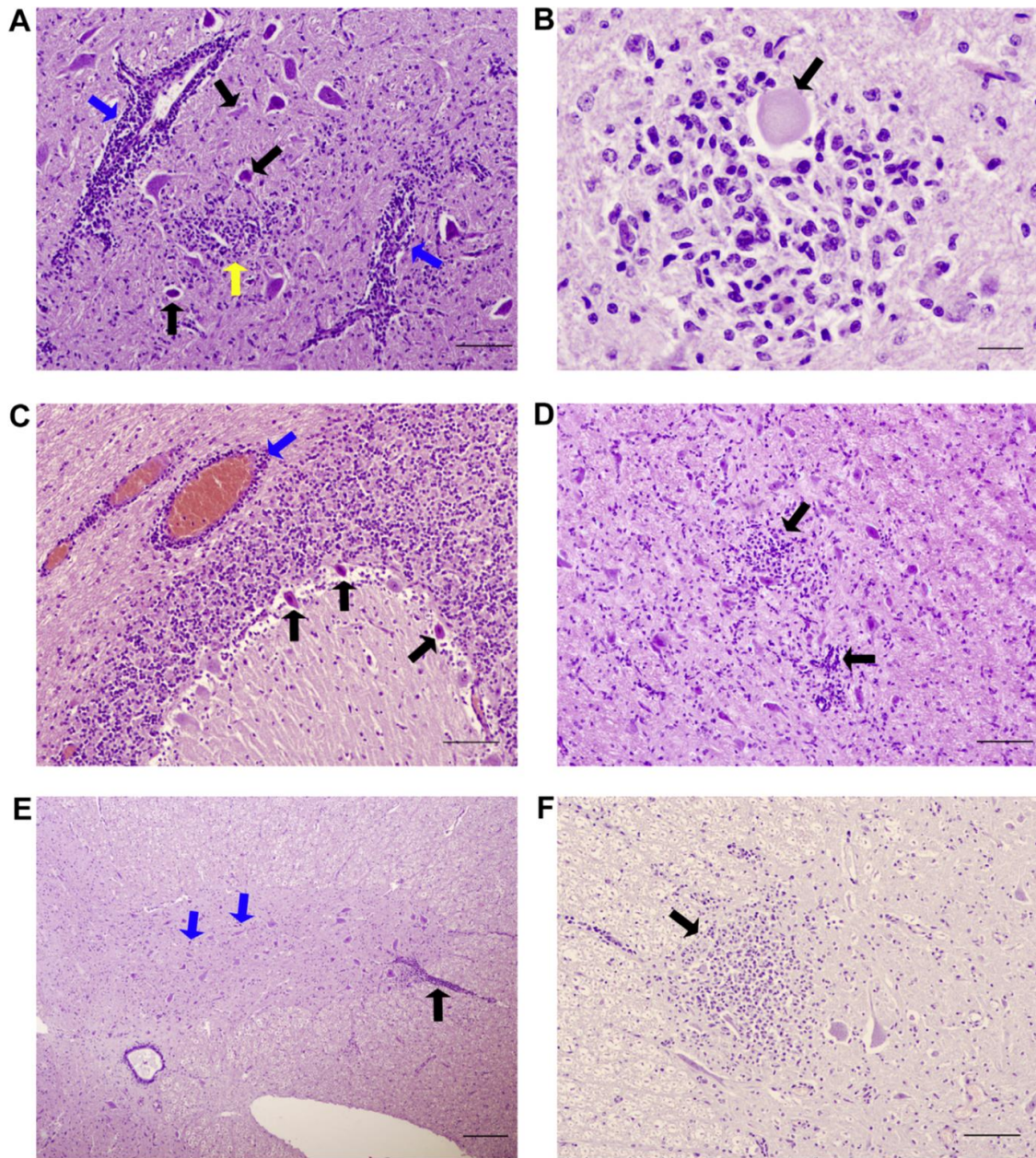


Fig. 3. Histological lesions (Grade IV) observed in lambs challenged experimentally with SGEV by subcutaneous (A, B, C and D) and intravenous (E and F) routes. (A) Medulla oblongata, olivary nucleus: note neuron necrosis (black arrows), perivascular cuffing (blue arrows) and foci of gliosis (yellow arrow). Bar, 100 μ m. (B) Cerebellum: note degenerate neuron (arrow) and satellitism. Bar, 20 μ m. (C) Cerebellum: note perivascular cuffing (blue arrow) and degeneration and necrosis of Purkinje cells (black arrows). Bar, 100 μ m. (D) Medulla oblongata, trigeminal nucleus: note loss of neurons and foci of gliosis (black arrows). Bar, 100 μ m. (E) Spinal cord, lumbar region: note perivascular cuffing (black arrow) affecting both grey and white matter and neuron degeneration (blue arrows) in ventral horn. Bar, 200 μ m. (F) Spinal cord, cervical region: note gliosis (arrow) and loss of neurons in grey matter. Bar, 100 μ m. All sections stained by HE.

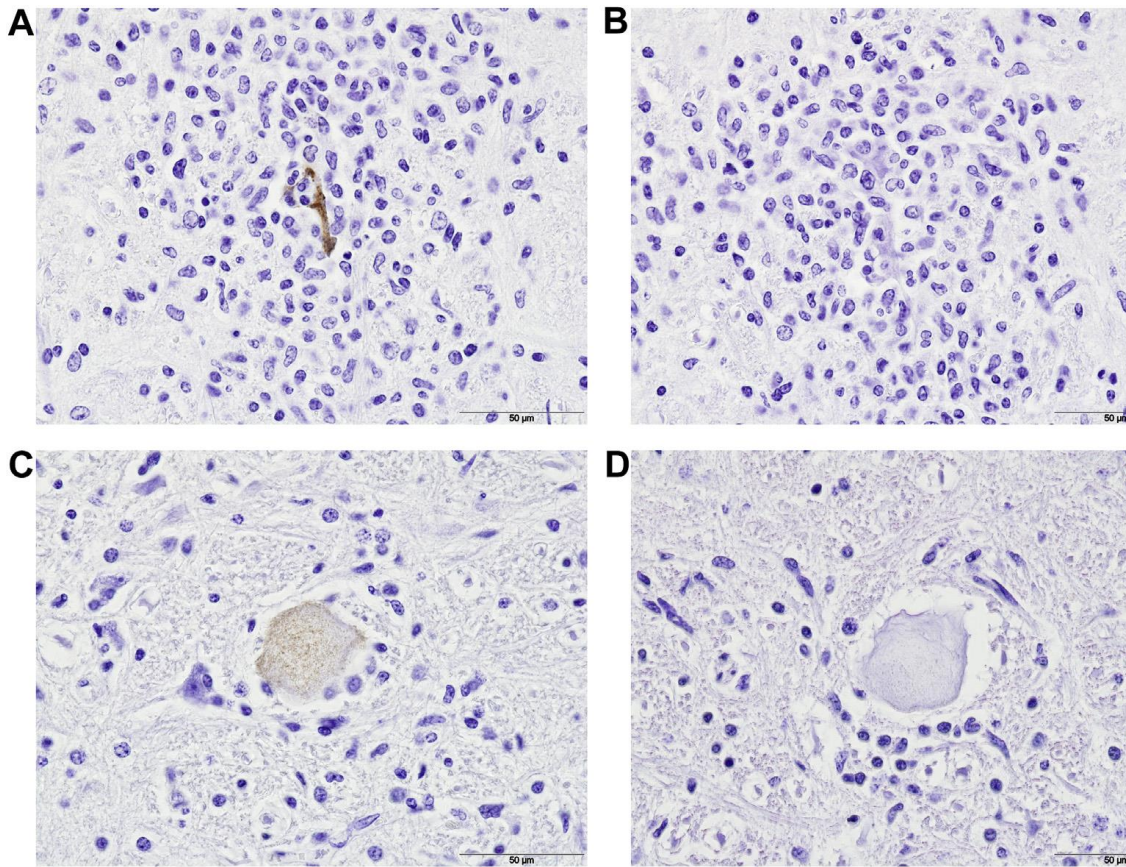


Fig. 4. Immunohistochemical labelling of SGEV antigen. Bars, 50 µm. (A) Ventral pons: note labelling within the centre of a glial focus (animal 26). (B) Negative control preparation on a semiserial section of (A), note absence of immunolabelling. (C) Medulla oblongata: note intracytoplasmic fine punctate labelling within a necrotic neuron (animal 28). (D) Negative control preparation on a semiserial section of (C), note absence of immunolabelling.

SGEV RNA Load

Peak SGEV RNA load in serum occurred at 4 dpc in group IV and 5 dpc in group SC and declined to the limit of detection by 5 and 7 dpc, respectively (Fig. 5). Viral RNA copy numbers were not significantly different between groups SC and IV ($P = 0.3670$) and no SGEV was detected throughout the course of the study in any animal in the negative control group.

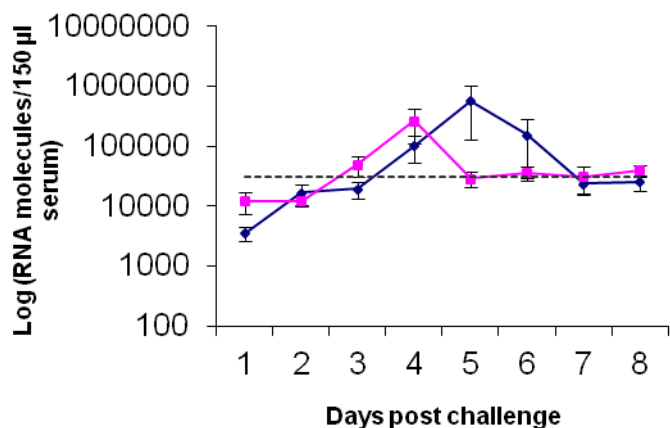


Fig. 5. Time course of SGEV RNA load in serum after SGEV experimental challenge by subcutaneous (blue diamonds) or intravenous (pink squares) routes. Note the delay in the start and peak of the SGEV RNA load in group SC compared with group IV. Viral RNA loads were determined by RT PCR assay. A standard curve was created using an RNA standard control plasmid for quantification. Data represent the mean of nine independent lambs per time point \pm standard error of mean (SEM) of the group. The dashed line represents the limit of detection (LoD) of the assay.

Correlation of Variables

In all SGEV challenged lambs, irrespective of route of challenge, rectal temperature (pyrexia) was correlated positively with SGEV RNA load ($r = 0.42068$, $P < 0.0001$) and negatively with serum levels of IgG ($r = 0.31922$, $P < 0.0001$), but not with IgM ($r = 0.03471$, $P = 0.6265$). Serum levels of IgG and IgM were correlated positively with each other ($r = 0.32516$, $P < 0.0001$). These correlations held for both the SC and IV groups, but with slightly different levels of significance. In group IV, rectal temperature was correlated positively with SGEV RNA load ($r = 0.26465$, $P = 0.0292$) and negatively with IgG ($r = -0.42046$, $P < 0.0001$), while IgG and IgM were correlated positively ($r = 0.29219$, $P = 0.0049$) with each other. In group SC, temperature was positively correlated with SGEV RNA load ($r = 0.53873$, $P < 0.0001$) and negatively with IgG ($r = -0.22868$, $P = 0.0292$), while both IgG and IgM were correlated positively ($r = 0.35237$, $P = 0.0006$). No other significant associations were observed.

Discussion

This study is the first to show that SGEV can infect sheep by both of the subcutaneous and intravenous routes, resulting in neurological clinical disease with extensive, and frequently severe, histological lesions in the CNS. However, although SGEV caused clinical neurological disease, it did not result in the death of any lamb over the course of the experiment, which is similar to experimental challenge of goats with SGEV (Salinas *et al.*, 2017). This non-fatal outcome has been seen frequently in experimental infections with LIV in sheep (Doherty and Reid, 1971a; Reid *et al.*, 1971; Sheanan *et al.*, 2002) and is considered to be associated with infection dose, inoculation route, immune status and, most importantly, the amount of stress, in the broadest sense, that the infected animals are subjected to after challenge (Doherty and Reid 1971a; Sheanan *et al.*, 2002). The experimental animals in this study were protected from nutritional, climatic and predator stressors, and kept in relatively small groups, all of which resulted in a relatively stress-free environment and therefore may underestimate the mortality rate under field conditions.

Both subcutaneous and intravenous routes of experimental challenge with SGEV were effective and induced histological lesions in the CNS and clinical disease in lambs, which were more severe when the challenge was intravenous. Subcutaneous challenge with SGEV in goats resulted in 5/9 animals developing neurological clinical signs (Salinas *et al.*, 2017), in contrast to only 3/9 lambs in this study. Experimental infections of sheep with LIV by the subcutaneous route at a similar, lower than one log, challenge dose (2.5×10^6 – $10^{6.6}$ PFU/animal) resulted in 2/8 sheep developing neurological clinical signs (Doherty and Reid, 1971a; Reid and Doherty, 1971), comparable with the results obtained in this study. These differences between the species could indicate a greater degree of susceptibility of goats than lambs to SGEV. This may be due to a number of factors such as difference in affinity of the host's viral receptor or in host immune response, as suggested by Mansfield *et al.* (2016) with respect to studies on the different susceptibilities of sheep to LIV and TBEV. In contrast with group SC, 6/9 group IV lambs developed neurological clinical signs with a greater and earlier onset of pyrexia than those challenged subcutaneously. This suggests that the intravenous route was more efficient than the subcutaneous route in establishing infection in the CNS which is supported by the more rapid peak in SGEV RNA load in serum found in

group IV. Additionally, translocation of the virus from the subcutis to the central nervous system may be different between the two species. However, the incubation period in the lambs was comparable, by either route of infection, to that found in goats challenged experimentally with SGEV (Salinas *et al.*, 2017), which confirmed the virulence of the SGEV isolate used.

Experimental challenge of lambs with SGEV caused severe, non-suppurative encephalomyelitis (grades III and IV) in 14/18 lambs (7/9 group SC and 7/9 group IV). However, only 4/9 goats showed grade III lesions and none had grade IV lesions with an identical challenge (Salinas *et al.*, 2017), suggesting that lambs may be more susceptible to SGEV-induced histological lesion formation than goats. This could be due to differences in the individual animals' immune responses, but equally due to differences in the immune responses of sheep and goats to identical pathogens (Maclachlan *et al.*, 2009), as a more effective specific inflammatory response could prevent spread of infection in nervous tissue in lambs by neutralizing free virus (Doherty *et al.*, 1971). Phenotyping of the lymphocytes present in CNS histological lesions could help to investigate this hypothesis and should be taken into account in future studies.

The development of clinical signs of louping ill may be accounted for by the extensive loss of neurons due to the tropism LIV has for this specific cell type, together with the induced inflammatory response and subsequent vascular damage (Webb, 1968; Doherty and Reid, 1971b). The neurological clinical signs (i.e. muscular tremors, ataxia and incoordination) induced in the lambs by both challenge routes are consistent with the SGEV-induced histological lesions present in the cerebral cortex, thalamus, hippocampus and cerebellum, and throughout the spinal cord. However, in goats, SGEV did not induce significant lesions in the cerebral cortex (Salinas *et al.*, 2017), but was more similar to the lesion profile present in lambs challenged experimentally with LIV, where the thalamus and hippocampus are more predominantly affected (Doherty and Reid, 1971a; Sheanan *et al.*, 2002). This suggests that SGEV produces a different lesion profile in lambs compared with goats, but the mechanism of this is, as yet, unknown. Although lambs challenged subcutaneously with SGEV developed more severe lesions on the ipsilateral side of the brain, suggesting a neurotropic

rather than haematogenous entry to the CNS, the incubation period was too short for this to have occurred and haematogenous spread after the initial rise of viral load in serum was the probable pathogenesis. The reason for the ipsilateral lesion distribution in group SC is unknown.

The lack of any notable immunolabelling of SGEV in tissue sections was probably due to lack, or very low levels, of virus present at the time of the necropsy examinations (12 and 17 dpc) as the viral RNA load in serum had abated by 5–7 dpc as confirmed by the qRT-PCR results. Additionally, any remaining virus in the CNS would be highly bound by host antibody, probably reducing access to the specific epitope recognized by the mouse monoclonal anti-LIV antibody.

The antibody response in lambs (IgM and IgG) may have protected the animals from death, although this was not sufficiently effective to prevent viral replication, histological lesions and clinical disease. The observed associations between those variables (IgM and IgG) indicate a slower development of disease in the group challenged subcutaneously, the route more closely mimicking natural infection, which is presumed to be tick-borne; RNA load was greater in this group, but so was the variability between individuals. This high viral RNA load in serum could be interpreted as an adaptation of the virus to improve the likelihood of transmission by haematophagous arthropods, as occurs with LIV transmission where initial replication occurs in lymphoid tissues prior to release in to the blood and subsequent colonization of the CNS (Jeffries *et al.*, 2014).

In conclusion, experimental challenge with SGEV caused moderate to severe histological lesions in the CNS and clinical disease in sheep challenged by both the subcutaneous and intravenous routes, with more severe lesions and clinical disease following intravenous challenge. The clinical presentation, pathogenesis, lesion morphology and distribution shows that SGEV is very similar to LIV, so any disease control plan must take into account any host species and their associated ticks as potential viral reservoirs. It also raises the possibility that previous diagnoses of LIV or SSEV in sheep in Spain may have actually been due to SGEV and specific discriminatory diagnostics are required for definitive diagnosis.

Acknowledgments

We thank C. Pérez Martínez (University of León), R. González (SERIDA) and C. Underwood and V. Forbes (Moredun Research Institute) for technical support. This study was funded by a grant from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), reference number E-RTA2013-00013-C04-04 (FEDER co-funded) and the Rural and Environment Science and Analytical Services (RESAS) division of the Scottish Government.

Conflict of Interest Statement

The authors declare no conflict of interest with respect to publication of this manuscript.

References

- Balseiro A, Royo LJ, Pérez Martínez C, Fernández de Mera IG, Höfle U *et al.* (2012) Louping ill in goats, Spain, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, **18**, 976-978.
- Dagleish MP, Benavides J, Chianini F (2010) Immunohistochemical diagnosis of infectious diseases of sheep. *Small Ruminant Research*, **92**, 19-35.
- Doherty PC, Reid HW (1971a) Experimental louping-ill in sheep and lambs. II. Neuropathology. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 331-337.
- Doherty PC, Reid HW (1971b) Louping ill encephalomyelitis in the sheep: II. Distribution of virus and lesions in nervous tissue. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 531-536.
- Doherty PC, Reid HW, Smith W (1971) Louping-ill encephalomyelitis in the sheep. IV. Nature of perivascular inflammatory reaction. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 545-549.
- Jeffries CL, Mansfield KL, Phipps LP, Wakeley PR, Mears R *et al.* (2014) Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. *Journal of General Virology*, **95**, 1005-1014.
- Klaus C, Ziegler U, Kalthoff D, Hoffmann B, Beer M (2014) Tick-borne encephalitis virus (TBEV) – findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *Veterinary Research*, **10**, 78.

- Maclachlan NJ, Drew CP, Darpel KE, Worwa G (2009) The pathology and pathogenesis of bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*, **141**, 1-16.
- Mansfield KL, Balseiro A, Johnson N, Ayllón N, Höfle U *et al.* (2015) Identification and characterization of a novel tick-borne flavivirus subtype in goats (*Capra hircus*) in Spain. *Journal of General Virology*, **96**, 1676-1681.
- Mansfield KL, Johnson N, Banyard AC, Núñez A, Baylis M *et al.* (2016) Innate and adaptive immune responses to tick-borne flavivirus infection in sheep. *Veterinary Microbiology*, **185**, 20-28.
- Reid HW, Doherty PC (1971) Experimental louping-ill in sheep and lambs. I. Viraemia and the antibody response. *Journal of Comparative Pathology*, **81**, 291-298.
- Salinas LM, Casais R, García Marín JF, Dalton KP, del Cerro A *et al.* (2017) Vaccination against louping ill virus protects goats against experimental challenge with Spanish goat encephalitis virus. *Journal of Comparative Pathology*, in press.
- Sheahan BJ, Moore M, Atkins GJ (2002) The pathogenicity of louping ill virus for mice and lambs. *Journal of Comparative Pathology*, **126**, 137-146.
- Venugopal K, Buckley A, Reid HW, Gould EA (1992) Nucleotide sequence of the envelope glycoprotein of Negishi virus shows very close homology to Louping ill virus. *Virology*, **190**, 515-521.
- Webb HE (1968) Virus diseases and the nervous system: a symposium [held at Sommerville College, Oxford in July, 1968]. In: CWM Whitty, JT Hughes, FO MacCallum, Eds., Blackwell Scientific, Oxford, pp. 169e177.



Short communication

3. Trabajo #3. Neurological syndrome in goats associated with *Ipomoea trifida* and *Ipomoea carnea* containing calystegines

Luis Manuel Salinas^{a,d}, Ana Balseiro^{b,*}, William Jirón^c, Alan Peralta^c, David Muñoz^c, Jorge Fajardo^c, Elena Gayo^d, Ileana Zorhaya Martínez^{e,d}, Franklin Riet-Correa^f, Dale R. Gardner^g, Juan Francisco García Marín^d

a Universidad Internacional Antonio de Valdivieso (UNIAV), Rivas, Nicaragua

b Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), Centro de Biotecnología Animal, Gijón, Asturias, Spain

c Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN), León, Nicaragua

d Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana, León, Spain

e Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (UPAEP), México

f Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela. Colonia, Uruguay

g Poisonous Plant Research Laboratory, Logan, UT, USA

*Corresponding author. SERIDA, Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario, Centro de Biotecnología Animal, 33394, Gijón, Asturias, Spain. E-mail address: abalseiro@serida.org (A. Balseiro).

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.291>

Received 16 September 2018; Received in revised form 7 November 2018;

Accepted 9 November 2018.

Available online 14 November 2018.

0041-0101/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abstract

A disease characterized by ataxia, tremors and nystagmus had been observed in goats in Nicaragua. The main histologic lesions were loss and neuronal vacuolation of Purkinje cells and Wallerian-like degeneration mainly in the cerebellum, suggesting a glycoprotein storage

disease. *Ipomoea carnea* and *Ipomoea trifida* found in the paddocks were negative for swainsonine, but contained calystegines at 0.02% and 0.06% suggesting that the disease was caused by these substances, which are competitive inhibitors of β -glucosidase and α -galactosidase activities.

Keywords: Goat, Poisoning, *Ipomoea trifida*, *Ipomoea carnea*, Calystegines, Nicaragua

Poisoning by swainsonine containing plants, including *Ipomoea* spp. *Turbina cordata*, *Sida carpinifolia*, *Swainsona* spp. *Astragalus* spp. and *Oxytropis* spp. in ruminants are usually characterized by rough hair coat, depression, weight loss, and nervous clinical signs including difficulties in rising, ataxia, hypermetria, tremors, especially of the head and neck, lateral swaying of the head and nystagmus (De Balogh et al., 1999; Stegelmeier et al., 1999; Barbosa et al., 2006; Carvalho de Lucena et al., 2014). The main histological lesions found in affected animals consist of vacuolation of the perikaria and axonal dystrophy in neurons of all regions of the nervous system, being more prominent in the Purkinje cells of the cerebellum and in neurons of the cerebellar nuclei, where loss of cells with minimal inflammation is a common feature. Vacuolation is also observed in various organs such as parenchymal pancreatic acinar cells, hepatocytes, thyroid follicular epithelial cells, tubular epithelial cells of the kidney and phagocytic cells of the spleen and lymph nodes (De Balogh et al., 1999; Barbosa et al., 2006). In this report, we describe a neurological syndrome in goats in Nicaragua associated with the ingestion of *Ipomoea* spp.

The disease occurred in the region of Malpaisillo, León, Nicaragua, since 2007. The geographical position is 120° 40' latitude north and 860° 34' latitude west, at 92.28m above sea level (EcuRed, 2018). The climate is tropical savannah, characterized by a marked dry season of 6–7 months from November to May, with an average temperature of 26.8 °C and an average annual relative humidity of 76.0% (Climate-Data, 2018). The disease affected goats of any age within a herd (usually composed of 4–20 goats). New cases appeared mainly in October–November during the rainy season although animals died throughout the year. Of the affected animals, some died in 2–3 days, some survived for a long time and others died from complications due to recumbence or because they were euthanized. Animals that survived continued to display neurological signs such as tremors, nystagmus or ataxia,

although they did not lose their appetite and maintained a regular body condition. Some goats even became pregnant and had completely healthy kids. *Ipomoea nil*, *Ipomoea trifida* (Fig. 1a) and *Ipomoea carnea* (Fig. 1b), three plants considered endemic in Nicaragua (Aguirre et al., 2009), were found in the paddocks. The farmers reported that goats preferred to consume those plants in preference to other available vegetation. Other herds in the same region did not appear affected although those herds were housed and grazed in paddocks with different vegetation that did not include *Ipomoea* spp.

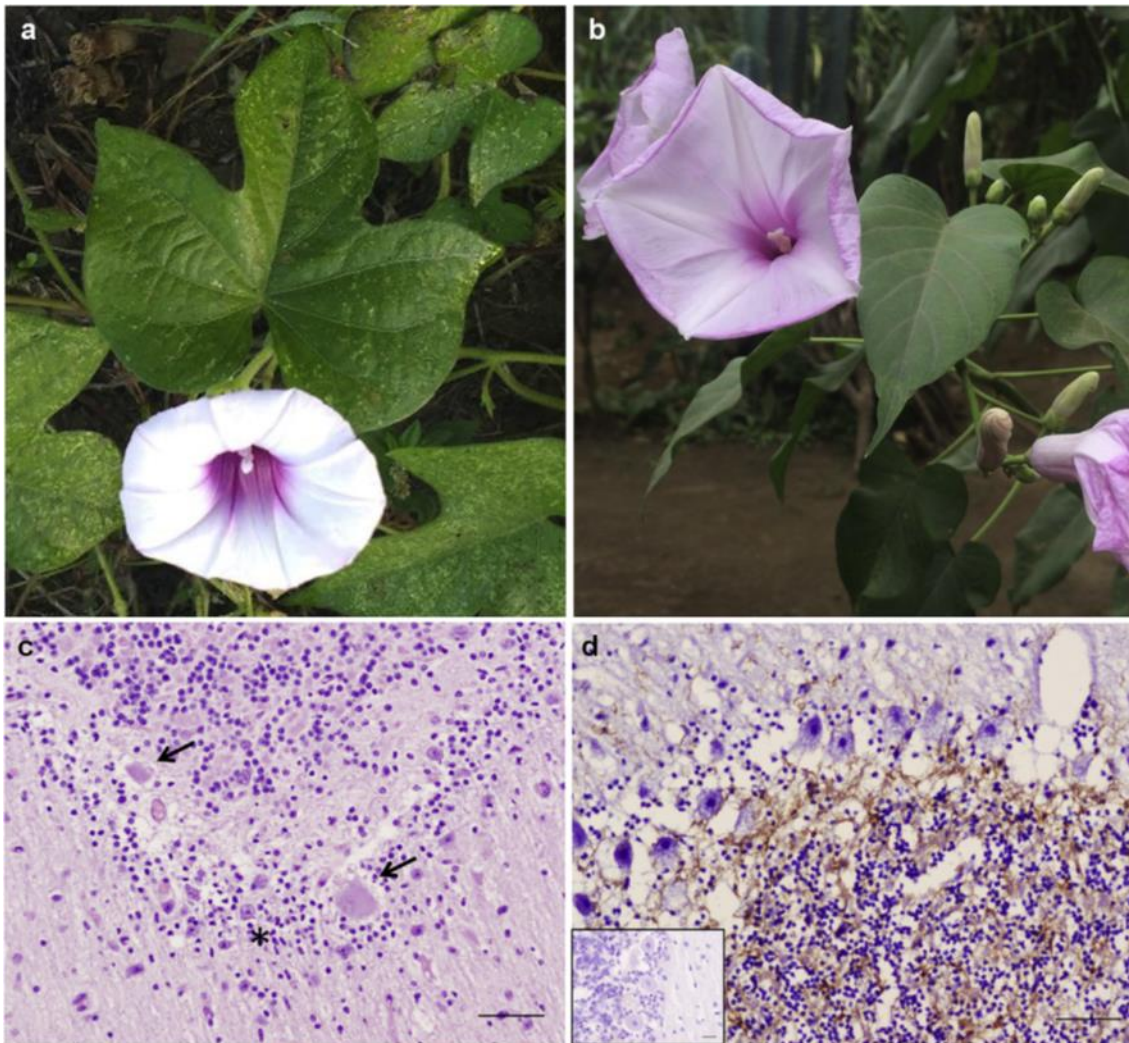


Fig. 1. *Ipomoea* species from Nicaragua and histological lesions associated with their ingestion in goats. a) *Ipomoea trifida*. b) *Ipomoea carnea*. c) Loss of Purkinje cells is observed in cerebellum, with some remaining cells showing cytoplasmic vacuolization (arrows). Proliferation of Bergmann glial cells is also observed (asterisk). Haematoxylin and eosin stain, bar = 50 μ m d) A significant increase in the number of GFAP+ astrocytes in granular and molecular layer in cerebellum, indicative of chronic tissue damage using immunohistochemistry technique.

Presence of numerous intracytoplasmic storage vacuoles in Purkinje cells is also observed. Bar = 50 μ m. Inset: Negative control. Bar = 20 μ m.

Twenty-four female goats (8 months to 3-years-old) from three affected farms were studied. Farm 1 presented cases since 2008 and consisted of 10 goats, including three goats showing nervous signs described below and seven without them. Farm 2 had cases since 2014 and consisted of 10 goats, including four goats with similar nervous clinical signs and six without them. Finally, farm 3 presented cases since 2015 and consisted of four goats with similar nervous clinical signs. During the clinical investigation goats presented regular body condition and good appetite. The most relevant clinical signs were intention tremors including lateral head movements, bilateral nystagmus, ataxia, and paresis of the hindquarters with gait difficulty (see Supplementary material). Clinical signs got worse when the goats were disturbed or frightened.

Blood samples in EDTA tubes were obtained from the jugular vein of 20 goats for biochemical and biometric studies. Sampling was conducted in accordance with guidelines regarding animal welfare. Samples were processed in a HumaCount 30TS analyzer (Human, Wiesbaden, Germany) configured in veterinary mode. Serum concentration of creatinine, phosphorus, glucose, calcium, magnesium, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, total bilirubin, direct and indirect bilirubin, gammaglutaryl transaminase (GGT) activity, total proteins, globulins, uric acid, creatinine kinase (CPK) activity, blood urea nitrogen, alkaline phosphatase, albumin and lactate dehydrogenase (LDH) were determined by colorimetric methods (Human, Wiesbaden, Germany) using a Chemwell 2902 kit. Urine was obtained by spontaneous urination and collected in 10 ml test tubes (two samples from each animal). The sample was divided into two parts: one containing 10% buffered formalin for sediment examination, and the second without formalin for physical and chemical examination. The physical examination was performed immediately after collecting the sample. Chemical examination consisted of photometric measurements of creatinine, total proteins and minerals (calcium, phosphorus and magnesium), using a Chemwell 2902 spectrophotometer by colorimetric methods (Human, Wiesbaden, Germany).

Descriptive statistics was performed and values were expressed as mean \pm standard deviation. In the hematological analysis eosinophils were slightly increased ($11.29 \pm 9.17\%$)

when compared to the reference levels for goat (1–8%). The following minerals were decreased: phosphorus (3.93 ± 1.28 mg/dL); magnesium (1.10 ± 0.10 mg/dL) and calcium x phosphorus product (29.90 ± 9.87 mg/dL). The remaining hematological parameters were within the reference values for the species. In the liver profile AST activity was increased (273.42 ± 92.72 U/L) when compared to reference levels for goat (66–230 U/L). Renal function was not altered.

A serological study of 10 animals (farm 1) was carried out to detect antibodies against small ruminant lentiviruses (Maedi-Visna and caprine Arthritis Encephalitis). The ELITEST® ELISA test (Hyphen BioMed, Neuville-Oise, France) was used for this purpose. All animals studied were negative for small ruminant lentiviruses.

Eight goats that were found dead in the farms after showing chronic clinical signs (farm 1: n=2, farm 2: n=2, farm 3: n=4) were submitted for a complete necropsy and gross lesions recorded. Samples of heart, lung, kidney, liver, spleen, pancreas, lymph nodes, gut, skeletal muscle, and the whole central nervous system (CNS) were fixed in 10% neutral formaline. Transversal sections were obtained from the brain (cerebral cortical regions - frontal, parietal and occipital lobes -, optic chiasma, corpus callosum, hypothalamus, thalamus, midbrain, cerebellum, pons and medulla oblongata) and from the spinal cord (cervical, thoracic, lumbar and sacral). All samples for histology were processed routinely through graded alcohols and xylol and embedded in paraffin wax. Sections (4 μ m) from each block were mounted on glass microscope slides and stained with haematoxylin and eosin and Krüber-Barrera stain. Semi-serial sections of samples from midbrain, cerebellum, medulla oblongata and cervical spinal cord were subjected to immunohistochemistry (IHC) following manufacturer's instructions, using a monoclonal mouse anti-swine glial fibrillary acid protein (GFAP) astrocyte antibody (clone 5C10) (EncorBiotechnology, Gainesville, United States) and the Avidin-Biotin complex (ABC) kit (Vector Laboratories, San Diego, United States). Positive (goat suffering Louping ill disease) and negative (a healthy goat and an additional slide of each paraffin embedded tissue with the omission of the primary antibody) controls were used in each run.

No gross lesions were observed on necropsies. Histological lesions were observed in the CNS of the eight goats and consisted of neuronal vacuolation in some Purkinje cells, in other neurons of granular and molecular layers of the cerebellum, and in a small number of neurons in midbrain and medulla oblongata. Evident loss of Purkinje cells was also observed in the cerebellum, with proliferation of Bergmann glial cells (Fig. 1c), and occasionally atrophy of the molecular layer. Wallerianlike degeneration with presence of axonal spheroids, and vacuoles (myelin ellipsoids), some of them containing axonal residues, were observed mainly in the cerebellar granular layer and white matter of the cerebellum and cerebellar peduncles, but also in midbrain, pons, medulla oblongata and spinal cord. IHC revealed a significant increase in the number of GFAP+ astrocytes compare to the negative control, indicative of chronic tissue damage, with higher numbers occurring in the cerebellum (Fig. 1d), although it was also observed in midbrain and medulla oblongata. No relevant microscopic lesions were found in the samples of lungs, kidney, liver, spleen, pancreas, gut or muscle.

Samples of *I. nil* (n=18), *I. trifida* (n=18) and *I. carnea* (n=18) were collected in groups of 6 plants from the area where cases occurred in three different months: February and April in 2017 (dry season) and by the end of June in 2018 (rainy season). A representative plant sample from each species was pressed and identified by the Herbarium from Universidad Autónoma of Nicaragua where voucher specimens are deposited. Leaf material from each species in groups of the six mixed plants collected in February and April 2017 was allowed to air dry and then ground. Samples from June 2018 were dried individually. Samples of the dry ground material collected mixed or individually were shipped to the USDA, ARS, Poisonous Plant Research Laboratory (Logan, Utah, USA) and analyzed for swainsonine, calystegines and indole diterpene alkaloids using previously published methods (Gardner et al., 2001; Cook et al., 2015; Lee et al., 2017). All samples were negative for swainsonine and indole diterpene alkaloids (Table 1). *Ipomoea trifida* and *I. carnea* were both found to contain calystegines B1, B2, B3 and C1 (Table 1).

Table 1**Analysis of Ipomoea species for swainsonine, calystegines and indole diterpene alkaloids.**

Sample	Swainsonine	Calystegines				Indole Diterpenes
		B ₁	B ₂	B ₃	C ₁	
Analysis of groups of six mixed plants						
<i>Ipomoea nil</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Ipomoea trifida</i>	n.d.	0.02	0.06	n.a.	0.06	n.d.
<i>Ipomoea carnea</i>	n.d.	0.02	0.05	n.a.	0.02	n.d.
Analysis of six individual plants						
<i>Ipomoea nil</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.
<i>Ipomoea trifida</i>	n.d.	0.030	0.018	0.001	0.002	n.a.
		0.018	0.014	0.001	0.004	
		0.008	0.014	0.001	0.004	
		0.027	0.025	0.003	0.003	
		0.030	0.018	0.001	0.002	
		0.012	0.011	0.001	0.003	
<i>Ipomoea carnea</i>	n.d.	0.011	0.000	0.000	0.000	n.a.
		0.008	0.000	0.000	0.000	
		0.008	0.000	0.000	0.000	
		0.007	0.023	0.004	0.008	
		0.009	0.000	0.000	0.000	
		0.011	0.000	0.000	0.000	

Concentration reported as % dry weight. n.a.=not analyzed, n.d.=none detected, =<0.001% (swainsonine),<0.01% (calystegines and indole diterpenes).

The epidemiologic data, clinical signs, biochemical results (significant increase of AST activity in serum) and pathology reported herein are similar to those observed in *Ipomoea* spp. poisoning in other studies and countries i.e. Brazil (Schumacher Henrique et al., 2003; Barbosa et al., 2006), suggesting that the disease is caused by some of the *Ipomoea* species found in the paddocks. *Ipomoea* spp. induce a glycoprotein storage disease with clinical signs related to lesions in the cerebellum, brain stem and spinal cord (Radostits et al., 1999; Scott, 2004; Armien et al., 2007; Mayhew, 2009; Cantile and Youssef, 2016), that has been attributed to the indolizidine alkaloid swainsonine, an inhibitor of lysosomal α -mannosidase and Golgi mannosidase II (Tokarnia et al., 1960; De Balogh et al., 1999). The absence of swainsonine in all our samples suggests that swainsonine may not be the only toxin involved in *Ipomoea* poisoning. Swainsonine production has been related with the presence of endophytic fungi in plants of the *Ipomoea* genus (Cook et al., 2013, 2014), that were not observed in this study. Previous work has shown that some plants and even whole populations

of this genus are not infected with swainsonine producing endophytes and consequently do not contain swainsonine (Cook et al., 2014). Calystegines do not appear to be associated with endophytes and they are probably plant produce secondary metabolites (Ikeda et al., 2003). Cook et al. (2013) also demonstrated that *I. carnea* plants infected with fungal endosymbiont produced swainsonine but not the calystegines. The importance of calystegines as a cause of disease has not been determined. It has been suggested that calystegines may enhance swainsonine toxicity; however, purified calystegines have not produced neurologic disease experimentally in rats (Hueza et al., 2005). This is the first report in which swainsonine-like neurologic disease has been associated with ingestion of *Ipomoea* spp. containing only calystegines. Calystegines B1 and C1 are potent competitive inhibitors of β -glucosidase activities and calystegine B2 is a strong competitive inhibitor of the α -galactosidase activity (Asano et al., 1997). In this study, chemical analysis of calystegines in the three species showed normal concentrations for B1 and B3 (see Table 10) (Hueza et al., 2005; Gotardo et al., 2016). However both *I. carnea* and *I. trifida* showed normal or slightly higher concentrations for B2 in mixed plants (0.05–0.06%) (Hueza et al., 2005; Gotardo et al., 2016) and *I. trifida* clearly higher concentrations of C1 (0.06%) than measured in previous studies (0.03%, Gotardo et al., 2016), which could have influenced the clinical course of the disease in the absence of swainsonine. Other plants such as *Solanum dimidiatum* in United States, *S. fastigiatum* and *S. bonariense* in Brazil and Uruguay, and *S. kwebense* in South Africa are responsible for a cerebellar syndrome with similar vacuolation, degeneration, and loss of Purkinje cells in cattle (Riet-Correa et al., 1983; Barros et al., 1987; Van der Lugt et al., 2010). Calystegines were identified in *S. dimidiatum* and *S. kwebense* (Nash et al., 1993), although their role in that neurological disorder remains unknown.

Cook et al. (2015) found mean calystegine concentrations of 0.03 and 0.05 at two Brazilian geographical locations over a one year period, with the highest concentrations in October–November and March–April. Similarly, we found higher concentrations of calystegines in the plants collected in February and April, which means that during that period those plants could be potentially more poisonous. *Ipomoea trifida* and *I. carnea* in Nicaragua are usually present during the dry season, but cases of poisoning were observed during the whole year. Clinical recovery may or may not occur following cessation of

exposure. When the animals stop eating the plant, the lesions can be reversible or not, depending on the time of ingestion. If the animals stop eating the plant within the first 20–25 days after showing clinical signs, they recover (Barbosa et al., 2006; Lima et al., 2013), probably because the vacuolization is reversible due to the removal of the oligosaccharides from the lysosomes. On the other hand, after this period the lesions are irreversible, probably because of neuronal loss as observed in goats in this study. Thus, when some animals showing clinical signs are histologically examined during the time that there is no plant, no vacuolization, but only neuronal loss is found, mainly in the cerebellum. That could also explain the lack of vacuolization in cells of kidney, spleen or liver, a pathological feature commonly found in storage disease (Barbosa et al., 2006). In addition, calystegines are not considered responsible for the toxic effects on peripheral organs (Hueza et al., 2005). The preference of the goats for these plants despite of availability of others mentioned by the farmers, previously reported in intoxications by *I. carnea* and other swainsonine and calystegines-containing plants (De Balogh et al., 1999), might have influenced the apparition of cases. It is concluded that *I. trifida* and *I. carnea* plants that do not contain swainsonine, may cause a glycoprotein storage disease in goats with mainly loss and neuronal vacuolation of Purkinje cells and Wallerianlike degeneration in the cerebellum, and that the calystegine content in those plants may be the toxic compounds. An animal model should be established in future studies to confirm the toxicity of calystegines in *Ipomoea* species in the absence of swainsonine.

Ethical statement

Blood sampling was conducted in accordance with guidelines regarding animal welfare, obtained from jugular vein.

Acknowledgements

Authors thank Xochilt Acalt for providing information and accessibility to animals, Indiana Coronado (HULE) for identified the plants and Bryan Stegelmeier and Kevin P. Dalton for critically reviewing the paper.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.291>

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.291>.

Funding sources

This work was partially supported by a grant from Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Spain), reference number E-RTA2013-00013-C04-04 (FEDER cofunded).

Conflicts of interest

This work has not any conflict of interest.

References

- Aguirre, M., López, H., Morán, G., 2009. Flora arbustiva y rastrera presente en áreas de pastoreo de ganado caprino en 4 comunidades del municipio de Malpaisillo. UNAN León, Nicaragua.
- Armién, A.G., Tokarnia, C.H., Vargas Peixoto, P., Frese, K., 2007. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats Induced by *Ipomoea carnea* subsp. *fistulosa* (Convolvulaceae). *Vet. Pathol.* 44, 170–184.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., Hackett, L., Topping, J., Winchester, B., 1997. The effects of calystegines isolated from edible fruits and vegetables on mammalian liver glycosidases. *Glycobiology* 7, 1085–1088.
- Barbosa, R.C., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M., Lima, E.F., Barros, S.S., Gimeno, E.J., Molyneux, R.J., Gardner, D.R., 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, northeastern Brazil. *Toxicon* 47, 371–379.

- Barros, S.S., Riet-Correa, F., Andujar, M.B., Motta, A., Schild, A.L., 1987. *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* and *Solanum* subsp. poisoning in cattle: ultrastructural changes in the cerebellum. *Pesqui. Vet. Bras.* 7, 1–5.
- Cantile, C., Youssef, S., 2016. The Nervous system. In: Grant Maxie, M. (Ed.), *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals*, sixth ed. Elsevier, Missouri, pp. 250–406.
- Carvalho de Lucena, K.F., Rodrigues, J.M.N., Campos, E.M., Dantas, A.F.M., Pfister, J.A., Cook, D., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F., 2014. Poisoning by *Ipomoea asarifolia* in lambs by the ingestion of milk from ewes that ingest the plant. *Toxicon* 92, 129–132.
- Climate-Data, 2018. Clima Malpaisillo. <https://es.climate-data.org/america-del-norte/nicaragua/leon/malpaisillo-30565/>, Accessed date: 6 November 2018.
- Cook, D., Beaulieu, W.T., Mott, I.W., Riet-Correa, F., Gardner, D.R., Grum, D., Pfister, J.A., Clay, K., Marcolongo-Pereira, C., 2013. Production of the alkaloid swainsonine by a fungal endosymbiont of the Ascomycete order Chaetothyriales in the host *Ipomoea carnea*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3797–3803.
- Cook, D., Gardner, D.R., Pfister, J.A., 2014. Swainsonine-containing plants and their relationship to endophytic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 62, 7326–7334.
- Cook, D., Oliveira, C.A., Gardner, D.R., Pfister, J.A., Riet-Correa, F., 2015. Changes in swainsonine, calystegine and nitrogen concentrations on an annual basis in *Ipomoea carnea*. *Toxicon* 95, 62–66.
- De Balogh, K.K.I.M., Dimande, A.P., Van der Lugt, J.J., Molyneux, R.J., Naude, T.W., Welman, W.G., 1999. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 266–273.
- EcuRed, 2018. Malpaisillo, Nicaragua. [https://www.ecured.cu/Malpaisillo_\(Nicaragua\)](https://www.ecured.cu/Malpaisillo_(Nicaragua)), Accessed date: 6 November 2018.
- Gardner, D.R., Molyneux, R.J., Ralphs, M.H., 2001. Analysis of swainsonine: extraction methods, detection and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis* spp.). *J. Agric. Food Chem.* 49, 4573–4580.
- Gotardo, A.T., Pfister, J.A., Raspantini, P.C.F., Górnaiak, S.L., 2016. Maternal ingestion of *Ipomoea carnea*: effects on goat-kid bonding and behavior. *Toxins (Basel)* 8, 10–12.

- Hueza, I.M., Guerra, J.L., Haraguchi, M., Naoki, A., Górniak, S.L., 2005. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 57, 53–58.
- Ikeda, K., Kato, A., Adachi, I., Haraguchi, M., Asano, N., 2003. Alkaloids from the poisonous plant *Ipomoea carnea*: effects on intracellular lysosomal glycosidase activities in human lymphoblast cultures. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7642–7646.
- Lee, S.T., Gardner, D.R., Cook, D., 2017. Identification of indole diterpenes in *Ipomoea asarifolia* and *Ipomoea muelleri*, plants tremorgenic to livestock. *J. Agric. Food Chem.* 65, 5266–5277.
- Lima, D.D.C.C., Albuquerque, R.F., Rocha, B.P., Barros, M.E.G., Gardner, D.R., Medeiros, R.M.T., Riet-Correa, F., Mendonca, F.S., 2013. Lysosomal storage disease induced by the consumption of *Ipomoea verbascoidea* (Convulaceae) in goats in northeastern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.* 33, 867–872.
- Mayhew, I.G., 2009. *Large Animal Neurology*, second ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Nash, R.J., Rothschild, M., Porter, E.A., Watson, A.A., Waigh, R.D., Waterman, P.G., 1993. Calystegines in *Solanum* and *Datura* species and the death's head hawk-moth (*Acherontia atropus*). *Phytochemistry* 34, 1281–1283.
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., 1999. Diseases of the nervous system. In: Radostits, O., Gay, C., Hinchcliff, K., Constable, P. (Eds.), *Veterinary Medicine. A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, tenth ed. Saunders Ltd., Philadelphia, pp. 501–549.
- Riet-Correa, F., Motta, A., Schild, A.L., Summers, B.A., Oliveira, J.A., 1983. Intoxication by *Solanum fastigiatum* var. *fastigiatum* as a cause of cerebellar degeneration in cattle. *Cornell Vet.* 73, 240–256.
- Schumacher Henrique, B., Górniak, S.L., Dagli, M.L., Spinosa, H.S., 2003. The clinical, biochemical, haematological and pathological effects of long-term administration of *Ipomoea carnea* to growing goats. *Vet. Res. Commun.* 27, 311–319.
- Scott, P.R., 2004. Diagnostic techniques and clinicopathologic findings in ruminant neurologic disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 20, 215–230.
- Stegelmeier, B.L., James, L.F., Panter, K.E., Gardner, D.R., Pfister, J.A., Ralphs, M.H., Molyneux, R.J., 1999. Dose response of sheep poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 448–456.

- Tokarnia, C.H., Dobereiner, J., Canella, C.F.C., 1960. Estudo experimental sobre a toxidez do “canudo” (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes. *Arq. Biol. An. Rio de Janeiro* 3, 59–71.
- Van der Lugt, J.J., Bastianello, S.S., van Ederen, A.M., van Wilpe, E., 2010. Cerebellar cortical degeneration in cattle caused by *Solanum kwebense*. *Vet. J.* 185, 225–227.

VIII.DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Este capítulo se organiza en dos segmentos donde se hace una discusión general de los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de los artículos que constituyen esta tesis doctoral. La primera sección corresponde a la infección experimental con SGEV en cabritas y corderos, y la segunda, al estudio patológico de las alteraciones nerviosas en cabras en Nicaragua.

1. Discusión de resultados de la infección experimental con SGEV

Para este estudio se planteó como **Objetivo general (1)** la determinación de la relación existente entre la patogenia y la patología manifestada por cabritos y corderos infectados experimentalmente con SGEV frente a los casos naturales reportados de esta enfermedad, de tal manera que permitiera aumentar el conocimiento sobre la viremia para el establecimiento de medidas de control aplicables en el campo. Este objetivo general engloba a los primeros tres objetivos específicos y parte del objetivo número cinco. Los informes obtenidos de este estudio son los primeros de este tipo que demuestran la infección con SGEV en cabras y ovejas. En la discusión general se plantea lo siguiente:

Objetivo 1

Para el objetivo específico número 1 correspondiente a la evaluación de la distribución, y gravedad de las lesiones en los cabritos y corderos infectados experimentalmente con el SGEV frente a los infectados naturalmente con SGEV, se concluye lo siguiente:

Al momento de la necropsia de los animales no se observaron alteraciones macroscópicas en ningún órgano, especialmente en encéfalo que orientaran hacia una meningoencefalitis. Lo que sí se pudo observar fue una leve congestión en los vasos meníngeos y que se presume estuvo asociada al método de eutanasia. Microscópicamente la infección experimental con SGEV causó una encefalomiелitis no supurativa en el 100% (9/9) de las cabritas del subgrupo control, con lesiones que fueron clasificadas según su gravedad, extensión y distribución en el SNC en grado I, II y III. En el caso de los corderos inoculados vía SC se observó encefalomiелitis no supurativa en el 94% (8/9) de los animales, clasificadas en grado I, III y IV. Estos resultados difieren de los presentados por Doherty y Sheahan en la infección

experimental con el LIV donde, solamente 1/7 cabras y 2/8 ovejas presentaron lesiones histológicas en SNC (Doherty & Reid, 1971; Sheahan et al, 2002). Estas diferencias en la tasa de morbilidad entre las especies podrían indicar un mayor grado de susceptibilidad en cabritas al SGEV respecto a los corderos y que podría deberse a una serie de factores como la diferencia en la afinidad del virus por receptores virales o diferencias en la respuesta inmune del huésped, similar a lo observado por Mansfield et al (2016) en sus estudios sobre las diferencias de susceptibilidad de la oveja a la infección con LIV y TBEV.

Tanto en corderos (5/9) como en cabritas (4/9) las lesiones microscópicas de mayor frecuencia y gravedad fueron las de grado III (9/18) (gráfico 1). Estas lesiones presentaron distribución multifocal y se observaron principalmente en el mesencéfalo, cerebelo, médula oblongada y la porción cervical de la ME (Fig. 3A, trabajo 1). Como diferencia entre especies cabe mencionar que en los corderos se presentaron las lesiones más graves de grado IV en la corteza cerebral (2/9) (Fig. 3, trabajo 2).

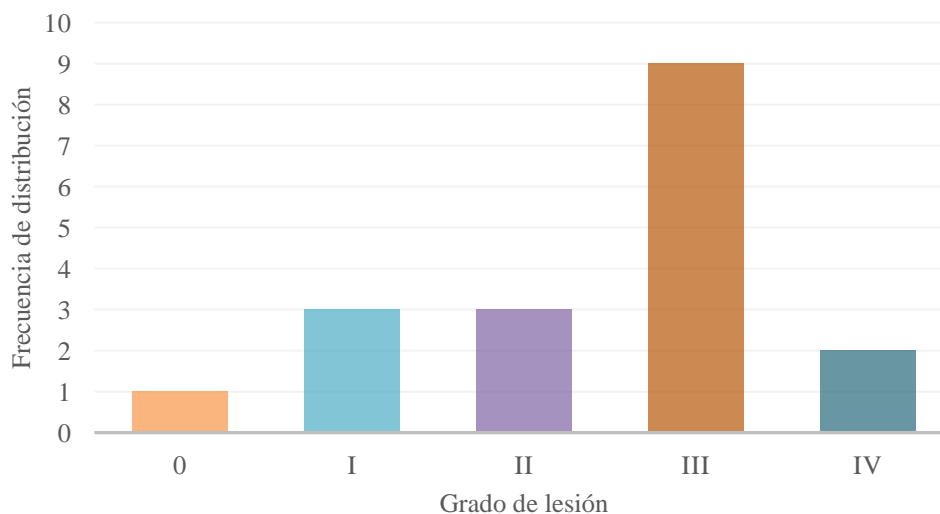


Gráfico 1. Frecuencia según grado de las lesiones histopatológicas observadas en cabritos y corderos infectados vía SC con SGEV. Las lesiones histopatológicas que más se observaron fueron las de grado III con frecuencia de 9 de 18 animales en total (50%), siendo los corderos los más afectados con 5 casos en total.

Respecto a las características de las lesiones según la vía de inoculación del virus, el grupo de corderos inoculados vía IV, presentaron a nivel del encéfalo lesiones histológicas de grado III (5/9) y de grado IV (2/9) de un total de nueve animales. Las lesiones eran idénticas a las observadas en cabritos y corderos inoculados vía SC. La única diferencia que se observó en este caso fue que en el grupo de corderos inoculados vía SC las lesiones en SN se presentaron en el lado ipsilateral a la inoculación del virus (lado derecho del cuello).

En general se observaron manguitos perivasculares, proliferación de células gliales, degeneración y necrosis neuronal (Fig. 3A, 3B, trabajo 1). En la capa granular del cerebelo se pudieron observar espacios vacíos por la degeneración y necrosis de las células de Purkinje y los focos de gliosis por la proliferación de las células de Bergman, una zona que fue afectada de forma variable en los corderos (Fig. 3 D y E, trabajo 1; y Fig. 3C trabajo 2). En la médula oblongada se observaron manguitos perivasculares, degeneración neuronal y necrosis con proliferación de las células de Bergman (gliosis). En varios núcleos del encéfalo (núcleo rojo, olivar, trigémino, accesorio medial, la formación reticular del nervio vago y nervios hipoglosos) se pudo observar pérdida neuronal (Fig. 3B trabajo 1; Fig. 3A y 3C trabajo 2). En la médula espinal se presentaron lesiones que consistían en manguitos perivasculares, gliosis y necrosis neuronal con mayor afección en el asta ventral, que como diferencia entre especies cabe mencionar que estas lesiones se observaron en todos los segmentos de la ME de corderos pero con mayor gravedad y extensión en la porción cervical, y en los cabritos se presentaron exclusivamente en la porción cervical de la ME (Fig. 3G y 3H, trabajo 1; Fig. 3E trabajo 2).

Todas las lesiones observadas en el estudio experimental de SGEV fueron indistinguibles de las observadas en la forma natural de la enfermedad, donde se identificaron manguitos perivasculares, neuronofagia y gliosis, especialmente en el hipotálamo, mesencéfalo, médula oblongada y médula espinal (Balseiro et al, 2012). Estas lesiones también se corresponden con las descripciones realizadas por Doherty & Reid (1971) y Sheahan (2002) en infecciones experimentales de ovejas con el LIV, con la diferencia que no se observaron lesiones en tálamo, hipotálamo e hipocampo en los corderos infectados experimentalmente con LIV. Respecto a las rutas de inoculación usadas en corderos no hubo diferencias en cuanto a la

gravedad y frecuencia de las lesiones y tampoco se observó lesiones microscópicas en otros órganos distintos a los del SN en ambas especies.

Las pruebas de HI realizadas en cada segmento del encéfalo de todos los animales estudiados no reflejaron la presencia del SGEV en tejidos, salvo una reacción muy débil que presentaron dos animales del grupo SC de corderos (ID 26 y 28). Únicamente se observó positividad en el citoplasma de las neuronas. La falta de inmunomarcaje en el SNC y los plexos braquiales a pesar de los altos niveles de anticuerpos en suero, sugiere que el virus había desaparecido antes del día del sacrificio después del aumento inicial de la carga de ARN, y que anticuerpos endógenos bloquearon el epítipo específico para reconocer el anticuerpo monoclonal anti-LIV (Reid & Chianini, 2007).

Objetivo 2

La discusión del **objetivo específico número 2** referente a la evaluación de las lesiones y su relación con los signos clínicos, la respuesta inmune y la viremia en cabritos y corderos infectados experimentalmente con SGEV indica lo siguiente:

Es importante recordar que el sistema inmune puede reaccionar de manera muy variada frente a las diferentes agresiones que, en dependencia del agente, la intensidad del daño, la vía de entrada y el órgano afectado así será la respuesta del organismo, pudiendo desencadenar una respuesta de tipo humoral o celular en muchos casos intercedida por mediadores químicos responsables de la activación de signos o síntomas indicativos de que en ese organismo se desarrolla una enfermedad (Jubb & Palmer's, 2015).

El desencadenamiento de la respuesta inmune por parte del SGEV en cabritas y corderos llevó a la manifestación de una serie de signos y síntomas clínicos de tipo general (fiebre, apatía, pérdida de apetito) a los que se le dio valor =1; y signos y síntomas de tipo neurológico (ataxia, incoordinación, temblores) a lo que se les asignó valor =2.

En ambos grupos de animales el primer signo clínico en manifestarse fue la fiebre, presentándose al tercer día postinfección y alcanzando su pico máximo entre los días 6 y 7.

La variación de la temperatura entre el subgrupo de corderos y los cabritos inoculados vía SC presentaron diferencias de medias significativas entre los grupos: En las cabras ($p=0.748$) y en los corderos ($p=0.084$).

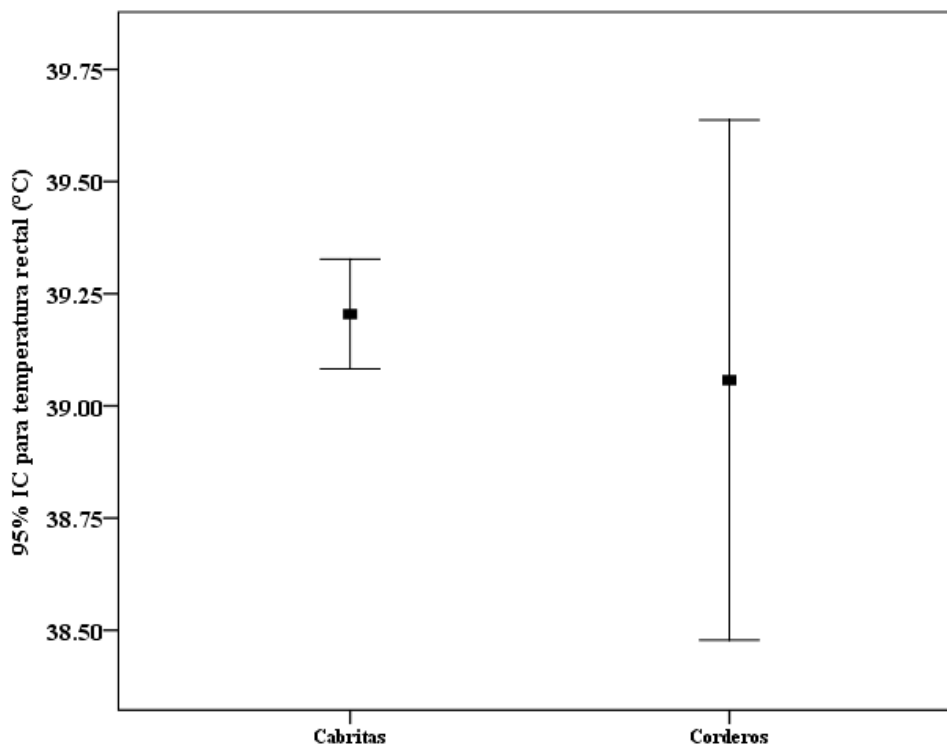


Gráfico 2. Comparación de la temperatura rectal en cabritos y corderos infectados con SGEV. Para la comparación de la temperatura rectal entre cabritas y corderos se procedió a realizar una prueba de T de Student para muestras independientes, asumiendo la existencia de distribución normal en la temperatura en las cabras ($p=0.748$) y en los corderos ($p=0.084$) según la prueba de Shapiro Wilk.

Un segundo signo clínico tipo 1 que se manifestó muy temprano en ambos grupos fue la depresión, que se observó al segundo y tercer día postinfección respectivamente coincidiendo con la fiebre y el pico inicial de ARN en cada caso. Otros signos clínicos que se manifestaron y coincidieron con la fiebre a partir del día 4 postinfección fueron la opacidad del pelaje y pérdida de la condición corporal. Esto indica que el periodo de incubación del SGEV en cabritos y corderos es menor en relación a lo reportado en las infecciones experimentales con LIV (Reid et al, 1984).

Durante el estudio, 8 animales (5 cabritos y 3 corderos) presentaron signos clínicos de tipo neurológico de manera variable a partir del día 4 postinfección, que persistieron hasta el día de la necropsia (Tabla 1, trabajo 1 y 2). En el caso de los corderos inoculados vía IV estos signos clínicos fueron más evidentes y de aparición más temprana que en los cabritos y corderos inoculados vía SC, lo que sugiere que la ruta de inoculación IV es más eficiente en el establecimiento de la infección del SGEV en el SNC, resultado que corrobora el mayor pico de carga de ARN de SGEV encontrado en el subgrupo de corderos inoculado vía IV.

Aunque la translocación del virus desde el subcutis hacia el SNC podría ser diferente entre ambas especies, el período de incubación del SGEV es comparable en cabritos y corderos por cualquier vía de infección, lo que confirma la virulencia del SGEV. La proporción de cabritos y corderos con signos neurológicos indican que la patogenicidad del SGEV es relativamente mayor a la de LIV en comparación a lo reportado Reid & Doherty (1971), Reid et al, (1984) y Sheahan et al (2002), en sus estudios análogos con LIV, donde 1 de 7 cabras y, 2 de 8 ovejas desarrollaron signos clínicos de tipo neurológico Otra diferencia fue que los signos clínicos neurológicos se presentaron entre los 4 a 13 días postinfección con el SGEV y entre los 12 y 13 días posteriores en los experimentos con el LIV. Estos datos indican que SGEV sería más patógeno que el LIV.

La viremia desarrollada y los signos clínicos observados tanto en cabritos como en corderos se relacionan directamente. En el subgrupo control positivo de cabritos se presentaron dos picos de la carga de ARN del SGEV, el primero se detectó al día 3 y el segundo al día 7 post infección (Fig. 4, trabajo 1). Este aumento inicial en la carga de ARN representa la replicación primaria del virus en el tejido linfoide que luego se disemina vía hematogena hacia el SNC. Su posterior reducción después de la aparición de la respuesta inmune humoral probablemente se deba al papel que juegan los anticuerpos neutralizantes en la eliminación de la viremia en animales infectados (Diamond et al, 2003).

En el subgrupo de cabritos vacunados la carga de ARN viral no varió desde el inicio del ensayo en relación con el subgrupo control positivo donde fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) (Fig. 4, trabajo 1).

En corderos la mayor carga de ARN viral de SGEV se produjo a los 4 días post infección en el subgrupo IV y al día 5 en el subgrupo SC, posteriormente esos niveles declinaron al 5° y 7° día respectivamente, por debajo de los niveles detectables (Fig. 5, trabajo 2). La carga de ARN viral no fue significativamente diferente entre ambos grupos ($P=0.3670$).

La infección experimental con el SGEV causó la enfermedad clínica y lesiones histológicas de moderadas a graves en el SNC de cabritos y corderos las que son similares a las descritas en casos experimentales de LIV reportados por Reid y Doherty (1971), lo que indica que, los casos diagnosticados en España de SSEV en ovinos en realidad se pudieran deber a una infección por el SGEV.

Los signos clínicos de tipo neurológico en animales infectados experimentalmente con SGEV fueron consistentes con las lesiones histológicas descritas en la corteza cerebral, hipocampo, cerebelo y médula espinal (Fig. 3, trabajo 1). En estudios realizados por Doherty & Reid (1971) sobre infecciones experimentales con LIV relacionan el desarrollo de signos clínicos de tipo neurológico con la extensa pérdida de neuronas debida al tropismo específico que tiene el LIV con este tipo de célula, junto con la respuesta inflamatoria inducida y el daño vascular posterior. Esos mismos estudios describen que 2 de 8 ovejas desarrollaron signos clínicos de tipo neurológico y lesiones histológicas en SNC. También Sheahan et al. (2002) reportaron que la gravedad de los signos clínicos se relaciona directamente con la extensión de las lesiones y el daño neuronal sufrido.

Los corderos infectados experimentalmente con el SGEV que presentaron signos clínicos de tipo neurológico más graves también presentaron lesiones más marcadas en las células de Purkinje, en las neuronas de los núcleos vestibulares y del asta ventral de la médula espinal, lo que explicaría los temblores del cuello (ataxia) como el signo clínico más común en corderos. Esta observación también la hicieron Doherty y Reid (1971) en la infección experimental con LIV en ovejas, lo que indica que el SGEV tiene las mismas características neurotrópicas. Las lesiones observadas consistían en manguitos perivasculares, focos de gliosis y necrosis neuronal presentes con mayor intensidad en la sustancia gris y el asta ventral (Fig. 3E, 3F, trabajo 2). Sin embargo, considerando la gravedad y similitud de las

lesiones en el cerebro con los casos de infección natural reportados por Balseiro (Balseiro et al, 2012) es poco probable que el virus se haya vuelto significativamente menos patógeno. Los signos clínicos de tipo neurológico fueron consecuentes con la presencia de lesiones de grado III, también con el mayor pico febril presentado por 3 cabritas (41.5 y 42 °C) y la carga de ARN de SGEV. Esta observación fue similar a la de otros estudios con virus que causan encefalitis (Prow et al, 2014).

En todos los corderos infectados experimentalmente con SGEV por ambas vías (SC, IV) existió una correlación positiva entre la temperatura rectal y la carga de ARN de SGEV ($r = 0,42068$, $P < 0.0001$) y negativa con los niveles séricos de IgG ($r = 0.31922$, $P < 0.0001$), pero no con los de IgM ($r = 0.03471$, $P = 0.6265$).

La inmunidad humoral en cabritos y corderos infectados con LIV y TBEV está mediada por la inmunoglobulina IgM, cuya presencia en el organismo de animales infectados se utiliza como indicador de una infección reciente. En el Reino Unido, donde el LI es una enfermedad endémica, la presencia de anticuerpos IgM se utiliza como indicador de una infección reciente con el LIV (Reid & Chianini, 2007). En los ensayos previos a la infección experimental con SGEV se usó la técnica ELISA para detectar los niveles de Ac IgM e IgG contra TBEV en los sueros de los 40 animales y se demostró que éstos tenían niveles de anticuerpos contra los TBEV muy por debajo de los niveles mínimos de corte indicados por el fabricante.

Las asociaciones observadas entre las variables IgM e IgG indicaron un desarrollo más lento de la enfermedad en el subgrupo de corderos inoculados vía SC donde la carga de ARN fue mayor, pero muy variable entre individuos. Esta carga de ARN viral alta en el suero podría ser interpretada como una adaptación del virus para mejorar la probabilidad de transmisión por artrópodos hematófagos, como ocurre con la transmisión del LIV donde la replicación inicial ocurre en los tejidos linfoides antes de liberarse en la sangre y la posteriormente colonizar el SNC (Jeffries et al, 2014). La respuesta de anticuerpos (IgM e IgG) en corderos pudo haber protegido a los animales de la muerte, aunque esto no fue

suficientemente efectivo para prevenir la replicación viral, la enfermedad clínica y las lesiones histológicas.

Los hallazgos de este trabajo indican que, al usar el ELISA IgM en cabras, sería posible detectar animales recientemente infectados entre 6 y 15 días después de la infección, un intervalo muy corto de tiempo para su posible aplicación en el campo (Fig. 1, trabajo 2). Sin embargo, bajo condiciones de campo y en una gran población, las infecciones naturales no ocurrirían simultáneamente lo que ampliaría la ventana de utilidad del ELISA para detectar IgG. Por lo tanto, para propósitos de diagnóstico en áreas endémicas se podría considerar el uso del ELISA para la detección de IgM M y/o la carga viral de SGEV por PCR. Por el contrario, la determinación de la concentración para IgG sería útil para conocer el nivel de exposición de una población, así como para la evaluación de la respuesta vacunal. En ambos casos se demuestra que las pruebas serológicas son muy útiles para evaluar el estado epidemiológico de los rebaños.

Durante el desarrollo experimental no murió ningún animal a causa de la enfermedad, salvo un cabrito vacunado que murió por acidosis ruminal, contrario a lo que ocurrió en la infección natural por SGEV donde el virus causó la muerte de todos los animales clínicamente infectados (Balseiro et al, 2012). En estudios experimentales con LIV tampoco se observó mortalidad (Reid & Doherty, 1971; Doherty & Reid, 1971; Sheahan et al, 2002). Esta diferencia en la tasa de mortalidad entre la infección natural y la infección experimental pudo deberse a ciertos factores como la raza de cabras Bermeya en la que ocurrió el brote inicial de SGEV, una raza rara en peligro de extinción altamente endogámica y probablemente con poca diversidad genética que la haga más susceptible a infecciones. Otro factor pudo ser que el grupo de cabras había sido trasladado recientemente a un área endémica (Balseiro et al, 2012). Otra posibilidad puede ser, que las cabras hubieran presentado infecciones concomitantes de SGEV y anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*), factor que se ha demostrado que aumenta drásticamente la tasa de mortalidad de animales infectados con Flavivirus (Reid et al, 1986). También pudo haber influido la dosis de SGEV inoculado y la ruta de infección favorecida por la inmunocompetencia individual, el estado nutricional, situaciones de estrés general en los animales y/o la pérdida de virulencia de la

cepa viral original después del cultivo, más la manipulación en el laboratorio (Reid et al, 1984; Sheahan et al, 2002). La variación de patogenicidad del SGEV entre cabritas y coderos pudo deberse a la diferente susceptibilidad que presentan ambas especies a diversas enfermedades (Maclachlan et al, 2009). Por otra parte, se desconoce si las cabras son los huéspedes naturales del SGEV o por el contrario procede de otra especie, por ejemplo, el rebeco (*Rupicapra spp.*) (Ruíz-Fons et al, 2014).

Objetivo 3

En los resultados obtenidos para el **objetivo específico número 3**, correspondiente a la evaluación de la eficacia de una vacuna comercial frente a LI en cabritos infectados experimentalmente con SGEV, se observó que las concentraciones de IgG aumentaron y fueron mayores en el subgrupo vacunado (n=9) después de la dosis inicial y que continuaron aumentando constantemente después de la segunda dosis de vacuna y de la infección con el SGEV. Después de la segunda vacunación las concentraciones séricas de IgG aumentaron a partir del día 14 sobrepasando el valor de corte 7 días después (Fig. 2B, trabajo 1), mientras que en el subgrupo control positivo las concentraciones de IgG aumentaron a partir del día 8 post infección excediendo el valor de corte máximo al día 16 (Fig. 2B, trabajo 1). En ambos casos esos niveles de Ac se mantuvieron elevados hasta el día 28 cuando se sacrificó el último animal. Las concentraciones séricas de IgG en cabritos del subgrupo control positivo fueron significativamente menores entre los días 14 y 16 post infección ($P < 0.003$) en comparación con los vacunados. Ese aumento en las concentraciones de IgG en el subgrupo de cabritas vacunadas sugiere que la vacuna para LIV aprobada en ovejas presente reacción cruzada e induce protección y producción de IgG contra SGEV.

Con las IgM sucedió todo lo contrario, las concentraciones de estas inmunoglobulinas fueron significativamente más altas en el subgrupo control positivo ($P < 0.0001$) (Fig. 2, tabla 1. Trabajo 1). En este subgrupo de cabritos los niveles de IgM se presentaron entre los 6 a 21 días postinfección coincidiendo con la fiebre y los signos clínicos de tipo neurológico, mientras que en los cabritos vacunados los mayores niveles de anticuerpos IgM se presentaron entre los días 8 a 14, con un pico máximo el día 10 postinfección. Es muy probable que la aplicación de la vacuna haya retrasado y disminuido la respuesta de IgM ya

que en el subgrupo control positivo se observó una reacción rápida, una mayor concentración y una mayor duración de los niveles de IgM. Las crecientes concentraciones de IgM en los animales no vacunados no les protegió de la enfermedad, ni tampoco los anticuerpos IgG. Esto indica que la IgM no es tan eficiente en la limpieza de la carga de ARN o que las concentraciones inducidas durante este período de tiempo no fueron lo suficientemente altas como para contribuir a la protección.

La vacunación no indujo una respuesta de IgM detectable a pesar de la aplicación de dos dosis de vacuna administradas con 2 semanas de diferencia. La baja respuesta inicial de IgM a la vacunación pudo deberse a la naturaleza pentamérica de este Ac que reduce la accesibilidad a los epítomos de superficie para unirse con otros anticuerpos lo que disminuye sus concentraciones. Otro factor influyente en esta medición pudo ser la baja sensibilidad del ELISA utilizado ya que éste no fue desarrollado para ser usado en cabras infectadas con SGEV, aunque estudios previos habían demostrado reacción cruzada en cabras infectadas experimentalmente con el LIV, por lo que también se esperaba la misma reacción cruzada en el SGEV (Klaus et al, 2014). La baja concentración de IgM encontrada en el subgrupo de cabritos vacunados como respuesta a la infección con SGEV probablemente se debió a la presencia de IgG inducida por la vacuna que se une rápidamente al virus.

La vacuna comercial contra LIV aprobada para su uso en ovejas, por lo tanto, resultó 100% efectiva para inmunizar cabritos contra el SGEV ya que éstos no desarrollaron la enfermedad clínica ni tampoco lesiones histológicas. Además, ayudó a reducir la carga de ARN viral en sangre, lo que indica que la transmisión del virus a través de la garrapata vector podría prevenirse o al menos disminuirse.

2. Discusión de resultados obtenidos para el estudio patológico de las alteraciones nerviosas en cabras en Nicaragua

Para este apartado se planteó como objetivo general (2) la determinación del agente causante de las alteraciones nerviosas en cabras de Nicaragua mediante el estudio epidemiológico y patológico del proceso con el fin de establecer medidas de prevención y control que ayudasen a la reducción de la incidencia de esta enfermedad.

Objetivo 4

En el **objetivo específico número 4**, correspondiente a la identificación del agente responsable y a la descripción de las lesiones observadas en cabras, los resultados obtenidos durante la exploración clínica indicaron que los signos clínicos de tipo neurológico presentados por las cabras fueron repentinos y que consistían en movimientos laterales de la cabeza, nistagmo bilateral, ataxia y paresia de los cuartos traseros con dificultad para caminar, y que éstos aumentaban a medida los animales eran molestados o excitados.

Los estudios complementarios practicados en sangre y orina revelaron que los niveles de calcio, fósforo, magnesio y los productos de calcio/fósforo estaban disminuidos sin estar comprometida la función renal en relación a los valores de referencia para la especie. El análisis hematológico únicamente reveló un aumento en los eosinófilos y una ligera anemia. El perfil hepático indicó un aumento de aspartato aminotransferasa en comparación a los valores de referencia, y los resultados serológicos practicados para la detección de lentivirus CAE y Maedi Visna en pequeños rumiantes fueron negativos en estos casos.

A nivel macroscópico en ninguno de los órganos se observaron lesiones asociadas a una determinada enfermedad. Las lesiones histológicas se observaron exclusivamente en el tejido nervioso de las ocho cabras registradas y consistieron en vacuolización neuronal en células de Purkinje, en neuronas de la capa granular y molecular del cerebelo y en un pequeño número de neuronas del mesencéfalo y médula oblongada. También se observó pérdida evidente de células de Purkinje en el cerebelo, con la proliferación de células gliales de Bergmann (Fig. 1c, trabajo 3) y, ocasionalmente, atrofia de la capa molecular. En la capa

granular, en los pedúnculos cerebelosos y en la sustancia blanca del cerebelo se observó degeneración Walleriana que consistía en la presencia de esferas y vacuolas en axones neuronales. La IHC reveló un aumento significativo en el número de astrocitos GFAP+ en comparación con el control negativo, indicativo de daño tisular crónico, con números más altos en el cerebelo (Fig. 1d, trabajo 3).

Muchas de las alteraciones nerviosas presentadas por las cabras se han descrito en casos de encefalitis, abiotrofias, encefalopatías y deficiencias de cobre, pero las lesiones microscópicas descritas no eran compatibles con ninguno de estos procesos (Pugh, 2002; Jubb & Palmer's, 2015). Los datos epidemiológicos, los signos clínicos, los resultados bioquímicos (aumento significativo de la actividad AST en suero) y la histopatología descrita son similares a los observados en intoxicación por plantas del género *Ipomoea* en otros estudios en diferentes países (Schumacher, 2003; Barbosa et al, 2006; Armién, 2007), lo que sugería que la enfermedad estaba causada por algunas de las especies de *Ipomoea* presentes en los potreros. Este género de plantas contiene los alcaloides swainsonina y calisteginas que se han asociado a las enfermedades por almacenamiento lisosomal debido a que inhiben las enzimas α -manosidasa y β -manosidasa (Tokarnia, 1960; De Balogh, 1999; Barbosa et al, 2006; Cook et al, 2015).

Se recolectaron muestras de *Ipomoea nil* (n = 18), *Ipomoea trifida* (n = 18) e *Ipomoea carnea* (n = 18) en grupos de 6 plantas del área donde ocurrieron los casos, en tres meses diferentes: febrero y abril en 2017 (estación seca) y a fines de junio de 2018 (temporada de lluvias). Las muestras de plantas se secaron, posteriormente se molieron y se empacaron individualmente para su envío al USDA, ARS, Poisonous Plant Research Laboratory (Logan, Utah, EE. UU.). Las muestras de las plantas se analizaron en busca de los alcaloides swainsonina, calisteginas e indol diterpeno utilizando métodos publicados previamente (Gardner, 2001; Cook et al, 2015; Lee, 2017). Todas las muestras fueron negativas para los alcaloides swainsonina e indol diterpeno (Tabla 1, trabajo 3), pero se encontraron las calisteginas B1, B2, B3 y C1 en *I. trifida* e *I. carnea* (Tabla 1, trabajo 3).

La ausencia de swainsonina en todas las muestras se consideró un hallazgo relevante ya que significa que este no es el único alcaloide involucrado en el consumo de plantas del género *Ipomoea* como se pensaba hasta ese momento. La importancia de las calisteginas como causa de enfermedad no ha sido determinada hasta la fecha. Se ha sugerido que las calisteginas pueden aumentar la toxicidad de la swainsonina; sin embargo, las calisteginas purificadas no han producido enfermedad neurológica experimentalmente en ratas (Hueza, 2005). Este es el primer informe que reporta el desarrollo de esta enfermedad provocada por el alcaloide calistegina y no por swainsonina. Las calisteginas B1 y C1 son potentes inhibidores competitivos de las actividades de la β -glucosidasa y la calistegina B2 es un potente inhibidor competitivo de la actividad de la α -galactosidasa (Asano, 1997).

Estos resultados difieren a lo reportado en el estudio sobre los efectos de los alcaloides de *I. carnea* en la actividad de la glicosidasa lisosomal en linfoblastos humanos donde se concluye que, las calisteginas no mostraron inhibición de la β -glucosidasa, y que actúan como chaperones químicos, mejorando el plegamiento correcto y transporte de la enzima en los lisosomas y que hay poco riesgo de inducir toxicidad en el ganado (Kioko et al, 2003).

3. Sugerencias para el control de SGEV y las alteraciones nerviosas en cabras

Objetivo 5

Para el objetivo específico número 5, se planteó el diseño de un Sistema de Gestión Sanitaria y de control frente a un brote de SGEV y frente al agente responsable de las alteraciones nerviosas en cabras en Nicaragua. Se divide en dos apartados e incluye las recomendaciones más relevantes frente a estos casos.

3.1. Sugerencias para un buen control de SGEV en la Península Ibérica

Con los resultados obtenidos en este estudio se espera aportar a investigaciones futuras afines con el SGEV sugerencias para el diagnóstico, prevención y control a través de la gestión sanitaria responsable y económicamente factible en las explotaciones de pequeños rumiantes, que ayuden a evitar la diseminación de SGEV a otros territorios. Entre esas recomendaciones se encontrarían las siguientes:

- Desarrollo de acciones de vigilancia epidemiológica permanente para conocer la evolución en el espacio y el tiempo de la enfermedad y su interrelación con los factores que pueden condicionar su presentación. Se deben evaluar los factores de riesgo de diseminación e introducción del agente etiológico en la región de Asturias, especialmente en la explotación positiva a SGEV.

- Identificación de factores epidemiológicos y de manejo que puedan incrementar la persistencia de SGEV en el medio y en otras especies animales. Especialmente se deben realizar estudios dirigidos a la interacción entre fauna silvestre y especies domésticas en el entorno de la explotación caprina positiva a SGEV con el fin de determinar si en realidad es la cabra el huésped natural de esta enfermedad y cuál es su posible vector intermediario.

- Establecimiento de una guía de medidas de bioseguridad enfocadas a la movilización de animales y control de vectores en todas aquellas granjas circunscritas geográficamente a la zona problema para impedir el desarrollo o diseminación de la enfermedad.

- Los ensayos realizados con la prueba ELISA determinaron la presencia de IgG en fase temprana y de IgM en fase tardía en animales que enfermaron al ser infectados experimentalmente con SGEV, por lo que sería recomendable estandarizar esta prueba para usar en ganado caprino como prueba diagnóstica de esta enfermedad, ya que resulta sensible y económicamente accesible. El monitoreo serológico se debería realizar dos veces al año para detección de animales reactivos o portadores de SGEV.

- Tal como lo demuestra este estudio la vacunación de cabras con la vacuna contra LIV autorizada en ovejas es un método muy efectivo en el control de SGEV en animales individuales porque previene la aparición de la enfermedad clínica y de lesiones en el SNC de los animales infectados experimentalmente. En el caso de las cabras se debería realizar dos aplicaciones de la vacuna con quince días de diferencia para garantizar una inmunidad adecuada, y se debería vacunar antes de movilizar animales hacia zonas geográficas diferentes y después de la temporada de partos.

- Los resultados obtenidos respecto a la efectividad de la vacuna de LI en cabras infectadas con SGEV en este estudio han sido satisfactorios, pero es necesario realizar estudios más profundos y específicos de evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas en grandes poblaciones de cabras y en otras especies para garantizar que la vacunación es la herramienta principal para el control y prevención de SGEV.

- Comunicación y coordinación entre ganaderos y autoridades competentes para la actuación y ejecución de acciones al momento de los reportes de casos sospechosos.

- En la actualidad no hay ningún tratamiento, que no sea sintomático, para el control de la enfermedad, lo que significa que en estos momentos la prevalencia depende de la vacunación o del control del vector garrapata (Jeffries et al, 2014). Aunque las medidas aplicadas para el control de garrapatas no resulten satisfactoriamente efectivas contra éstas, es recomendable hacerlo en el momento o época del año en el que hay un mayor brote antes de que infesten a los animales sometidos a un cambio de zona o que comen libremente en los pastos.

3.2. Sugerencias para el control de las alteraciones neurológicas en cabras de Nicaragua

El problema se debe al consumo de plantas que resultan tóxicas para la cabra, y esto ocurre principalmente en la época seca cuando hay menor disponibilidad de alimentos. Esto obliga a garantizar el alimento adecuado tanto en calidad como cantidad para las cabras dentro de cada sistema de explotación caprina en los momentos de mayor carencia.

Las plantas del género *Ipomoea* son endémicas en Nicaragua y suelen aparecer al final de la época lluviosa lo que hace imposible tratar de erradicar estas plantas de nuestro medio. En estos casos el mejor método para prevenir este problema es controlar el pastoreo de las cabras y dirigir las hacia zonas donde la presencia de la planta sea menor.

IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. Los signos clínicos de tipo neurológico, y las lesiones microscópicas desarrolladas por cabritos y corderos infectados experimentalmente con el SGEV son similares a los descritos en la infección natural con SGEV en cabras asturianas y en infecciones experimentales con LIV en ovejas, con la diferencia de que la infección experimental no causó la muerte de ningún animal y que dichos signos clínicos y lesiones son de mayor gravedad en la infección natural.
2. La morbilidad provocada por la infección experimental de SGEV fue mayor en cabritos, pero la gravedad de las lesiones fue mayor en corderos que presentaron lesiones histológicas de grado IV, no observadas en cabritos. Esto podría significar una menor adaptación a esta cepa del virus por parte de los corderos y una mayor respuesta inmune a la misma por parte de los cabritos.
3. La vacuna frente a LIV, autorizada para emplear en ovejas, resultó 100% efectiva en la protección de cabritos frente al SGEV, ya que evitó la aparición de signos clínicos y el desarrollo de lesiones en el SNC. Por ello se propone su uso en la especie caprina empleando el mismo protocolo recomendado para la especie ovina.
4. El mejor método diagnóstico que se puede aplicar en casos de infecciones por el SGEV es la técnica ELISA para la detección de IgM en la fase aguda de la infección a nivel individual. Cuando la infección es crónica y afecta a poblaciones de cabras se recomienda la detección de IgG que puede permanecer detectable por largos periodos de tiempo cuando el animal sobrevive a la infección y se ha recuperado de la misma. El aislamiento del virus en sangre e identificación de éste mediante PCR no sería una opción factible de diagnóstico debido al corto periodo de replicación y viremia que desarrollan los animales.
5. Los signos clínicos neurológicos observados y las lesiones descritas en las cabras de Nicaragua se corresponden a lo reportado en otros estudios científicos realizados sobre intoxicación por ingestión de plantas del género *Ipomoea* en cabras. Se confirmaría que las plantas *I. trifida* e *I. carnea* son las responsables de la enfermedad por

almacenamiento de glucoproteínas en cabras en Nicaragua, causando pérdida y vacuolización de células de Purkinje y degeneración tipo Walleriana en el cerebelo.

6. Como particularidad de los resultados, es la primera vez que se relaciona a la planta *I. trifida* como causa de intoxicación en cabras. Otro hallazgo relevante es que el alcaloide calisteína aislado en las muestras de *I. trifida* e *I. carnea*, por primera vez se asocia directamente a intoxicación en cabras en ausencia de swainsonina, actuando como un inhibidor competitivo de las actividades de β -glucosidasa y α -galactosidasa. Esto sugiere que estamos ante una nueva patología asociada a intoxicación por plantas del género *Ipomoea*.
7. En las muestras de *Ipomoea* spp analizadas solamente se encontró el alcaloide calisteína, por tanto, en estudios futuros se debe establecer un modelo animal para confirmar la toxicidad de ésta, ya que hasta el momento la literatura científica atribuye la toxicidad a la swainsonina y un papel de potenciador a la calisteína.
8. Cabe recalcar que este género de plantas es endémico en Nicaragua y no es posible establecer como medida de control la erradicación total de la planta, por lo que la mejor opción es establecer pastos y sistemas de alimentación controlada para las cabras con el fin de evitar en lo posible el consumo de este género de plantas. Otra posibilidad debido al tamaño de las explotaciones y de las características de los potreros es realizar un control selectivo de la planta y la eliminación parcial de la misma.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, B. R., López, G. H., Morán, C. G., 2009. *Flora arbustiva y rastrera en áreas de pastoreo de ganado caprino en cuatro comunidades del municipio Malpaisillo, León, 2007-2008*. León: s.n.
- Armién, A.G., Tokarnia, C.H., Vargas, Peixoto P., Frese, K., 2007. Spontaneous and experimental glycoprotein storage disease of goats Induced by *Ipomoea subsp fistulosa* (Convolvaceae). *Veterinary Pathology*, Issue 44, pp. 170-184.
- Asano, N., Kato, A., Matsui, K., Watson, A.A., Nash, R.J., Molyneux, R.J., et al, 1997. The effects of calystegines isalates from edible fruits and vegetable on mammalian liver glycosidases. *Glycolbiology*, Issue 7, pp. 1085-1088.
- Balseiro, A., Royo, L.J., Pérez, Martínez C., Fernández de Mera I.G. et al, 2012. Louping Ill in Goats, Spain, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, Junio.18(6).
- Bannatyne, C. C., Wilson, R. L., Reid, H. W., Buxton, D., Pow I., 1980. Louping-ill virus infection of pigs. *Vet Rec*, 106(13).
- Barbosa, R. C., Riet-Correa, F., Medeiros, R.M.T., Lima, E.F., et al, 2006. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelii* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil.. *Toxicon*, August.47(371-379).
- Barrett, D., Collins, D.M., McGrath, G. & Muireagain, O., 2012. Seroprevalence of Louping Ill virus (LIV) antibodies in sheep submitted for post mortem examination in the North West of Ireland in 2011. *Irish Veterinary Journal*, 65(20).
- Benavides, J., Willoughby, K., Underwood, C., Newman, B., Mitchell, 2011. Encephalitis and neuronal necrosis in a 3-month-old suckled beef calf. *Veterinary Pathology*, 48(E1-E4).
- Bertrand, Y., Elva, A., Melik, W. & Johansson, M., 2012. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses.. *Plos One*, 7(31981).
- Blood, D.C., Radostits, O.M., Arundel, J.H., Gay, C.C., 1992. *Medicina Veterinaria*. Séptima edición. ed. México: Interamericana S.A de C.V..
- Breuer, H., Rangel, M. & Medina, E., 1982. Pharmacological properties of melochinine, an alkaloid producing Central American cattle paralysis.. *Toxicology*, 25(2-3:223-42).

- Carlini, R. C. & Ligabue-Braun, R., 2017. *Plant Toxins*. Porto Alegre: Springer.
- Cortinovis, C. and Caloni, F. Alkaloid-Containing Plants Poisonous to Cattle and Horses in Europe. *Toxins* 2015, 7(5301–5307).
- Carvalho de Lucena, K. F., Rodrigues, J., Campos É. M., et al., 2014. Poisoning by *Ipomoea asarifolia* in lambs by the ingestion of milk from ewes that ingest the plant. *Toxicon*, October.92(129-132).
- Caspe, S., Bendersky, D. & Barbera, P., 2008. *Plantas Tóxicas de la Provincia de Corrientes*, Corrientes: s.n.
- Colorado State University, 2017. Toxicoses of the Ruminant Nervous System. *Vet Clin Food Animal*, 33(111-138).
- Cook, D., Oliveira, C.A., Gardner, D. R., Pfister, J.A., Riet-Correa, G., Riet Correa, F. et al, 2015. Changes in swainsonine, calystegine, and nitrogen concentrations on an annual basis in *Ipomoea carnea*. *Toxicon*, 95(62-66).
- Cooper, Marion, R., Johnson, Anthony w. Poisonous plants and fungi in Britain. Animal and human poisoning. 1998. Second edition. London. The Stationery Office.
- Cranwell, M.P., Josephson M., K, Willoughby, L., Marriott, 2008. Louping ill in alpaca.. *Veterinary Record*, 162(28).
- Davidson, Marylin, Williams, H., Macleod, J.A., 1991. Louping ill in man: a forgotten disease. *Journal of infection*, 23(241-249).
- de Balogh, K.I.M., Dimande, A. P., van der Lugt, J.J., Molyneux, R.J., et al., 1999. A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, 11(266-273).
- de Lahunta, A. & Glass, E., 2009. *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*. Third edition. ed. St. Louis, Missouri: Elseiver.
- Diamond, M.S., Shrestha, B., Marri, A., Mahan, D., Engle, M., 2003. Cells antibody play critical roll in the immediate defense of disseminated infection by West Nile virus encephalitis virus. *Journal of virology*, 77(2578-2586).
- Doherty, P. & Reid, H., 1971. Experimental louping ill in sheep and lambs.. *Journal of Comparative pathology*, 81(331-337).
- Doherty, P.C.; Smith, W., Reid W., 1972. Louping Ill Encephalomyelitis en the sheep. Histopatogenesis of the fatal disease. *Comparative Pathology*, Volumen 82.

- Fernández de Luco, D., 1991. *Estudio sobre una encefalitis vírica similar al louping ill en el ganado ovino de la comunidad Autónoma Vasca*, Zaragoza.: s.n.
- Fletcher, J., 1937. Louping ill in the horse. *Vet Rec*, Issue 49, pp. 17-18.
- Freeman J. & Moore H., 1974. [En línea] Available at: https://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=es&prev=search&url=translate.google.com&sl=en&sp=nmt4&u=http://www.hhs.gov/&usg=ALkJrhiT8vxDsumUEjiKG8aO-r-f_WZIEQ. [Último acceso: 31 Enero 2018].
- Frieden, T., 2014. *paho.org*. [En línea] Available at: http://www.paho.org/nic/index.php?option=com_joomlabook&view=topic&id=346. [Último acceso: martes 06 marzo 2018].
- Gao, G.F., Hussain, M.H., Reid. H. W., Gould, E.A., 1993. Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus Res*, 30(129–144.).
- Gardner, D.R., Molyneux, R.J., Ralphs, M.H., 2001. Analysis of swainsonine: extraction methods, detection and measurement in populations of locoweeds (*Oxytropis* spp.). *J. Agric. Food Chem.*, Issue 49, pp. 4573-4580.
- Gilbert, L., Jones, L.D., Hudson, P.J., Gould, E. A., Reid, H.W., 2000. Role of small mammals in the persistence of louping-ill virus: field survey and tick co-feeding studies.. *Med Vet Entomology.*, 14(277-282).
- Grard, G., Moureau, G., Charrel, R.N., Lemasson, J.J., et al, 2007. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. *Virology*, 361(80–92).
- Gray, D.; Webster, K., Berry, J.B., 1988. Evidence of Louping ill and tick-borne fever in goats. *The Veterinary Record*, 122(66).
- Gray, J. S., 1991. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: vector of Lyme borreliosis., *Rev. Med. Vet. Entomol.*, 79(323-333).
- Gritsun, T. S., Nuttall, P. A. & Gould, E. A., 2003. Tick-borne flaviviruses. *Adv Virus Res*, 61(317–371.).

- Hao, Lu, Feng, Ma, Huan, Wang, Peng-shuai, Geng, et al, 2015a. The effects of swainsonine on the activity and expression of α -mannosidase in BRL-3A cells. *Toxicon*, June.99(44-50).
- Hao, L., Feng, M., Liang Z., Jianguo W., et al, 2015b. Swainsonine-induced apoptosis pathway in cerebral cortical neurons. *ELSEVIER*, October.102(34-37).
- Hubalek, Z., Pow, I., Reid, H. & Hussain, M., 1995. Antigenic similarity of central European encephalitis and louping-ill viruses. *Acta Virology*, 39(251-256).
- Hudson, P.J., Norman, R., Laurenson, M.K., Newborn, D., et al, 1995. Persistence and transmission of tick-borne viruses: *Ixodes ricinus* and louping-ill virus in red grouse populations. *Parasitology*, 111(s49-s58).
- Hueza, I.M., Guerra, J.L., Haraguchi, M., Naoki, A., Górnaiak, S.L., 2005. The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: a study in rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, Issue 57, pp. 53-58.
- Hyde, J., Nettleton, P., Marriott, L. & Willoughby, K., 2007. Louping ill in horses. *Vet Rec*, Issue 160, p. 532.
- Hyttel, P., Sinowatz, F. & Vejlsted, M., 2010. *Essentials of Domestic Animal Embriology*. First edited ed. Toronto: Elsevier.
- Iowa State University, 2009. *Infectious Encephalomyelitis of Sheep*, [cfsph.iastate.edu](http://www.cfsph.iastate.edu). [En línea] Available at: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/akabane-es.pdf>. [Último acceso: 19 Enero 2018].
- Jeffries, L., Mansfield, K.L., Phipps, L.P., Wakeley, P.R., et al, 2014. Louping ill virus: an endemic tick-borne disease of Great Britain. *Journal of General Virology*, 95(1005–1014).
- Jensen, P. M., Skarphedinsson, S. & Semenov, A., 2004. Densities of the tick (*Ixodes ricinus*) and coexistence of the louping ill virus and tick borne encephalitis virus on the island of Bornholm.. *Ugeskr Laeger.*, 166(2563-2565).
- Jones, L. D., Gaunt, M., Hails, R. S., Laurenson, K., Hudson, P. J., et al, 1997. Transmission of louping ill virus between infected and uninfected ticks co-feeding on mountain hares. *Med Vet Entomol*, 11(172-176).
- Jubb K. & Palmer's, 2015. *Pathology of Domestic Animals*. Sixth edition ed. s.l.:Saunders.

- Kyoko, I., Atsushi, K., Isao, A., Mitsue, H., & Naoki, A. Alkaloids from the Poisonous Plants *Ipomoea carnea*: Effects on Intracellular Lysosomal Glycosidase Activities in Human Lymphoblast Cultures. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51(7642-7646).
- Klaus, C., Ziegler, U., Kalthoff, D., Hoffman, D., Beer, M., 2014. Tick born encephalitis virus (TBEV)-finding on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera. *MC Veterinary Research*, 10(78).
- Koehler, J., Newcomer, B. W., Holland, M. & Caldwell, J. M., 2015. A Novel Inherited Cerebellar Abiotrophy in a Cohort of Related Goats. *Journal Comparative Pathology*, 153(135-139).
- Kumar, V., Abbas, A., K., Fausto, N., 2005. *Patología Estructural y Funcional, Robins & Cotran*. Septima edición ed. s.l.:McGraw Hill. Inertamericana.
- Labuda, M., Danielova, V., Jones, L. D. & Nuttall, P. A., 1993. Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during cofeeding of ticks. *Med Vet Entomol*, 7(339-342).
- Laurenson, M.K., Norman, R.A., Gilbert, L., Reid, H. W., Hudson, P.J, 2003. Identifying disease reservoirs in complex systems: mountain hares as reservoirs of ticks and louping-ill virus, pathogens of red grouse. *Journal Animal Ecology*, 72(177-185).
- Lee, S.T., Gardner, D.R., Cook, D., 2017. Identification of indole diterpenes in *Ipomoea asarifolia* and *Ipomoea muelleri*, plants tremorgenic to livestock. *J. Agric.*, Issue 65, pp. 5266-5277.
- Macaldawie, C., Patterson, I.A.P., Nettleton, P. F., Low, D., Buxton, D., 2005. Louping ill in llamas (*Lama glama*) in the hebrides. *Veterinary Record*, march.156(420-421).
- MacKenzie, C. P., Lewis, N. D., Smith, S. T. & Muir, R. W., 1973. Louping ill in a working collie. *Vet Rec*, Issue 92, pp. 354-356.
- Maclachlan, N.J., Drew, C.P., Darpel, K.E., Worwa, G., 2009. The Pathology and pathogenesis of bluetongue. *Journal of Comparative Pathology*, 141(1-16).
- Mansfield, K. L., Johnson N., Phipps L. P., Stephenson J. R., Fooks A. R., Solomon T, 2009. Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *Journal Gen Virol*, 90(1781-1794).

- Mansfield, K.L., Johnson N., Banyard A. C., Núñez A., et al, 2016. Innate and adaptative immune response to tick born flavivirus infection in sheep. *Veterinary Microbiology*, 185(20-28).
- Marín, M. S., Mckenzie, Gao, G.F., Antoniadis A., 1995. The virus causing encephalomyelitis in sheep in Spain: a new member of the tick-borne encephalitis group. *Veterinary Science*, 58(11-13).
- Marston, D. A., Mansfield, K.L., Mearns, R., Ellis, R.J., et al., 2013. Louping Ill Virus Genome Sequence Derived from the Spinal Cord of an Infected Lamb. *Genome A. Journals.ASM.org*, July, Agosto.1(4).
- McGuire, K., Holmes, E.C., Gao, G.F., Reid, H.W., Gould, E., 1998. Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis. *J Gen Virol*, 79(981–988).
- Medeiros, R. M. T., Barbosa, R. C., Riet-Correa, F., Lima E. F., et al., 2003. Tremorgenic syndrome in goats caused by *Ipomoea asarifolia* in Northeastern Brazil. *Toxicon*, February.41(933-935).
- Mendonça, F., Albuquerque, R., Evêncio-Neto, J., Freitas, S., et al., 2012. Alpha-mannosidosis in goats caused by the swainsonine-containing plant *Ipomoea verbascoidea*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24 (1)(90-95).
- Murphy, A., Gibbs, M., Horzinek, M. & Studert, M., 1999. *Veterinary Virology*. Third Edition. ed. San Diego: ELSEVIER.
- Murray, P., RosenthalK, S. & M.A., P., 2006. *Microbiología Médica*.. I Edición. ed. Madrid.: ELSEVIER..
- Norberg, P., Roth, A. & Bergström, T., 2013. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains.. *Virology*, 440(105-116.).OIE, 2018. [En línea] Available at: <http://www.oie.int/es/para-los-periodistas/onehealth-es/> [Último acceso: viernes 02 marzo 2018].
- OPS/OMS, N., 2018. [En línea] Available at: http://www.paho.org/nic/index.php?option=com_content&view=article&id=614:la-mitad-de-la-poblacion-de-las-americas-en-riesgo-de-contrar-enfermedades-transmitidas-por-pequenos-insectos-la-mitad-de-la-poblacion-de-las-americas-en-riesgo-de-contrar-enfermed. [Último acceso: martes 06 marzo 2018].

- Platt, F. M., Boland, B., van der Spoe, A. C., 2012. Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *Journal Cell Biology*, 199(5 (723-734)).
- Prow, N.A., Setoh, Y.X., Biron, R.M., Sester, D.P., Kim, K.S., et al, 2014. The Westh Nile virus-like Flavivirus Koutango is highly virulent in mice due to delayed viral clearance and the induction of a poor neutralizing antibody response. *Journal of Virology*, 88(9947-9962).
- Pugh, D. C., 2002. *Sheep and Goat Medicine*. First edition. ed. Philadelphia, Pennsylvania.: W. B. SAUNDERS COMPANY.
- Pusterla, N., Caplazi, P., Lutz, H. & Braun, U., 1999. Investigations on the treatment of cerebrospinal nematode infections in goats.. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.*, 106 (1)(22-4).
- Radostits, O., Mayhew, J. & Houston, D., 2002.. *Examen y diagnóstico clínico en Veterinaria*. Primera ed. Madrid: Ediciones Harcourt.
- Randolph, S. E., Green, R. M., Hoodless, A. N. & Peacey, M. F., 2002. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int J Parasitol*, 32(979–989).
- Reid, H. & Doherty, P., 1971. Experimental louping ill in sheep and lambs. Viremia and the antibody response. *Journal of Comparative Pathology*, 81(291-298).
- Reid, H. W., Barlow, R. M. & Boyce, J. B., 1976. Isolation of louping-ill virus from a roe deer (*Capreolus capreolus*). *Vet Rec*, 98(116).
- Reid, H. W., Barlow, R. M. & Pow, I., 1978a. Isolation of louping ill virus from red deer (*Cervus elaphus*). *Vet Rec*, Issue 463-464, p. 102.
- Reid, H.W., Duncan J.S., Phillips, J.D.P., Moss, R., Watson, A, 1978b. Studies on louping-ill virus (Flavivirus group) in wild red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*). *CAMB*, 81(321).
- Reid, H.W., Buxton, D., Pow, I., Finlayson, J., 1984. Transmission of louping-ill virus in goat milk. *Veterinary Record*, 114(163 - 165).
- Reid, H. & Pow, I., 1985. Excretion of louping-ill virus in ewe's milk.. *Vet Rec*, Nov.2(117 (18) - 470).

- Reid, H.W.; D., Buxton; I., Pow; T.A., Brodie; P.H., Holmes; et al., 1986. Response of sheep to experimental concurrent infection with tick-borne fever (*Cytoecetes phagocytophila*) and louping ill virus. *Research in Veterinary Science*, 41(56-62).
- Reid, H. & Chianini, F., 2007. *Louping ill*. In: *Disease in Sheep*. Oxford, Blackwell, pp. 250-255.
- Ríos, E.E., Cholich, L.A., Chileski, G., García, E.N., et al, 2015. Suspected natural lysosomal storage disease from ingestion of pink morning glory (*Ipomoea carnea*) in goats in northern Argentina. *Journal Veterinary Medicine Science*, Marzo.77(7)(847-850).
- Ross, H. M., Evans, C. C., Spence, J. A., Reid, H. W. & Krueger, N., 1994. Louping ill in free ranging pigs. *Vet Rec*, Issue 134, pp. 99-100.
- Ruíz-Fons, F., Balseiro, A., Willoughby, K., Oleaga, A., Dagleish, M.P., et al., 2014. Clinical infection of Cantabrian chamois (*Rupicapra pirenaica parva*) by louping ill virus: new concern mountain ungulate conservation?. *European Journal of wildlife Research*, 60(691-694).
- Schumacher, H.B., Górnjak, S.L., Dagli, M.L., Spinosa, H.S., 2003. The clinical, biochemical, haematological and pathological effects of long-term administration of *Ipomoea carnea* to growing goats. *Vet. Res. Commun.*, Issue 27, pp. 311-319.
- Schwentker, F.F., Thomas, M.D., Rivers, M.D. & Finkelstein, M., 1933. Observations on the Immunological Relation of poliomyelitis to Louping Ill. *Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research*, March. Issue 955.
- Sheahan, B.J., Moore, M., Atkins, G.J., 2002. The pathogenicity of louping ill virus for mice and lambs. *Journal of Comparative Pathology.*, 126(137-146).
- Smith, C. E., McMahon, D. A., O'Reilly, K. J., Wilson, A. L., Robertson J.M., 1964a. The epidemiology of louping ill in Ayrshire: the first year of studies in sheep. *J Hyg (Lond)*, Issue 62, pp. 53-68.
- Smith, C. E., Varma, M. G. & McMahon, D., 1964b. Isolation of louping ill from small mammals in Ayrshire, Scotland. *Nature*, Issue 203, pp. 992-993.
- Stephenson, J., Lee, J. & Wilton-Smith, P., 1984. Antigenic variation among members of the Tick-Borne Encephalitis Complex. *Gen Virol*, 65(81-89).

- Summers, B., Cummings, J. & de Lahunta, A., 1995. *Veterinary neuropathology*. St. Louis, MO.: Mosby.
- Takeda, S., Tanaka, H., Shimada, A., Morita, T., et al, 2014. Cerebellar Ataxia Suspected to Be Caused by *Oxytropis glabra* Poisoning in Western Mongolian Goats. *Journal Veterinary Medicine Science*, february.76 (6)(839-846).
- Timoney, P. J., Donnelly, W. J., Clements, L. O. & Fenlon, M., 1976. Encephalitis caused by louping ill virus in a group of horses in Ireland. *Equine Vet J*, Volumen 8, pp. 113-117.
- Tokarnia, C.H., Dobereiner, J., Canella, C.F.C., 1960. Estudo experimental sobre a toxides do "conudo" (*Ipomoea fistulosa* Mart.) em ruminantes.. *Arq. Biol. An.*, Issue 3, pp. 59-71.
- Twomey, D. F., Cranwell, M. P., Reid, H. W. & Tan, J. F. V., 2001. Louping ill on Dartmoor. *Vet Rec*, 149(687).
- Walkington, J., Hulgur, M. & Yates, D., 2013. A case of refractory seizures caused by an unusual zoonosis.. *J Intensive Care Soc.*, 14(65–67.).
- Walkley, R. & Jolly, S., 1997. Lysosomal Storage Diseases of Animals:An Essay in Comparative Pathology. *Veterinary pathology*, 34(527-548).
- Williams, H. & Thorburn, H., 1962. Serum antibodies to louping-ill virus. *Scott Med Jorunal*, 7(353-355).
- Williams, H., Thorburn, H. & Ziffo, G. S., 1963. Isolation of louping ill from the red grouse. *Nature*, Issue 200, pp. 193-194.