



# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**

**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**DETERMINACION DE LA ENCEFALOPATIA  
ESPONGIFORME OVINA ( SCRAPIE), MEDIANTE  
HISTOPATOLOGIA DE ENCEFALOS  
PROVENIENTES DE MATADEROS DE LA REGION  
XI DE CHILE.**

**Fabiola de Lourdes Ayala Villegas**

**Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Patología Animal.**

**Profesor Guía: Dr. Gustavo A. Farías Roldán**

**PROYECTO FINANCIADO POR EL SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO  
(SAG)**

**SANTIAGO – CHILE**

**2001**



# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**DETERMINACION DE LA ENCEFALOPATIA  
ESPONGIFORME OVINA ( SCRAPIE), MEDIANTE  
HISTOPATOLOGIA DE ENCEFALOS  
PROVENIENTES DE MATADEROS DE LA REGION  
XI DE CHILE.**

Fabiola de Lourdes Ayala Villegas

	<b>Calificación</b>	<b>Firma</b>
<b>Profesor Guía: Dr. Gusavo Farías</b>	.....	.....
<b>Profesor Consejero: Dr. Cesar Orostegui</b>	.....	.....
<b>Profesor Consejero: Dr. Claudio Lecocq</b>	.....	.....

SANTIAGO - CHILE

2001

# INDICE

1. RESUMEN .....	i
2. INTRODUCCIÓN .....	1
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	2
3.1 Antecedentes.....	2
3.2 Etiología.....	7
3.3	10
Patogenia.....	16
.....	19
3.4 Características generales de los priones.....	21 22
3.5 Salud pública.....	24
3.6 Epidemiología.....	30
3.7 Período de incubación.....	32
3.8 Diagnóstico.....	38
3.9 Diagnóstico diferencial.....	41
3.10 Control de la enfermedad.....	44
3.11 Situación mundial.....	44
3.12 Situación nacional.....	45
4. HIPÓTESIS.....	45
5. OBJETIVO GENERAL.....	46
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
7. MATERIAL Y MÉTODO .....	47
7.1 Obtención de encéfalos para el estudio.....	52
7.2 Obtención de los sitios de corte por laminación.....	53
7.3 Procesamiento de la muestra.....	53
7.4 Análisis de las muestras.....	65
8. RESULTADOS.....	68
9. DISCUSIÓN.....	69
10. CONCLUSIONES.....	
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	

## 1. RESUMEN

El scrapie ovino pertenece al grupo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), las que corresponden a enfermedades degenerativas y progresivas del sistema nervioso central (SNC), que se caracterizan por presentar un largo período de incubación y que culminan con la muerte del animal afectado.

Datos históricos indican que el scrapie es la enfermedad más antigua del grupo de las EET, siendo descrita hace más de 250 años en Europa.

El agente etiológico de la enfermedad corresponde a un prion (*proteinaceous infectious particle*), que es la isoforma anormal de una proteína celular, que aunque carece de ADN tiene la capacidad de replicarse sin la presencia de genes. Se caracteriza por una gran resistencia a la acción de agentes químicos y físicos y por lo mismo es muy difícil de erradicar de los lugares infectados.

Se sabe que el scrapie es una enfermedad del ganado ovino, que se reconoce por su signología clínica, sin embargo para un diagnóstico específico se requiere del examen histopatológico del encéfalo de los animales sospechosos, los que en el caso de ser positivos a la enfermedad, se caracterizan por presentar cambios espongiformes bilaterales y simétricos, tanto en el pericarion como en el neuropilo. La detección de formas anormales de una proteína de membrana del tejido nervioso del huésped llamada “proteína prion”, es útil como criterio adicional para confirmar el diagnóstico de la enfermedad, sin embargo en nuestro país el principal método de confirmación de la enfermedad es hasta ahora el estudio histopatológico del encéfalo.

La importancia a nivel mundial de esta enfermedad, es la de haber participado en la diseminación masiva de la enfermedad a otras especies animales, como lo es el ganado bovino Europeo en la denominada Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Este proceso se cree que se produce por medio del consumo de harinas de carne y hueso de origen ovino. Además existe la potencialidad de constituir una zoonosis, por el consumo de carne o subproductos de ovinos que cursan con la enfermedad. Este hecho concuerda con la aparición de una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob (nv CJD) en los humanos.

El presente trabajo constituye una parte de un estudio poblacional a nivel nacional que realiza el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), para detectar la eventual presencia del scrapie en Chile y de este modo, ayudar a conocer la situación epidemiológica de esta enfermedad en nuestro país.

Esta investigación se realizó en base al estudio histológico de 135 cerebros de ovinos mayores de 5 años, provenientes de mataderos de la XI región de Chile, en los que se utilizaron métodos, procedimientos y criterios histoanatomopatológicos reconocidos internacionalmente.

De esta forma el análisis de los resultados del presente estudio nos permite indicar que las principales alteraciones encontradas se agruparon en : lesiones vacuolares tanto en el pericarion neuronal como en el neuropilo (de presentación unilateral y en ningún caso bilaterales) y alteraciones que involucran cambios de tipo inflamatorio (manguitos perivasculares), depósitos pigmentarios, hallazgos parasitarios y lesiones traumático hemorrágicas.

Sin embargo, se puede concluir que los cambios observados en las muestras de los encéfalos examinados al microscopio, de acuerdo a sus características histopatológicas, no corresponden a lesiones atribuibles a scrapie ovino, sino que simplemente constituyen hallazgos histopatológicos, por ser lesiones aisladas y no presentar un patrón específico de ubicación en el SNC.

La importancia de este estudio radica en contribuir al conocimiento de la situación epidemiológica del scrapie ovino en nuestro país, así como también el de servir de base para futuras investigaciones relacionadas con el tema.

## 2. INTRODUCCIÓN

Existe un grupo de enfermedades neurodegenerativas que corresponden a las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET), al cual pertenece el scrapie o prurito lumbar ovino. Estas EET, tienen en común ser enfermedades degenerativas y progresivas del Sistema Nervioso Central (SNC), que presentan un largo período de incubación, son inevitablemente fatales y tienen como agente etiológico a un prion, que corresponde a una proteína infecciosa. El prion es un agente no convencional, resistente a tratamientos físicos y/o químicos y que no produce respuesta inmune en el huésped.

El scrapie ha tenido repercusiones económicas en la industria de alimentos para el consumo animal y humano, sobre todo en Europa, debido a su estrecha conexión con los brotes de encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y debido a la posibilidad de constituir una zoonosis, ya que se presume una asociación con la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeld - Jakob (nv CJD) que afecta al humano.

Dada la importancia económica y en salud pública de este trastorno, es muy importante que en los países en que aún se desconoce su situación, se realicen estudios epidemiológicos para detectar su eventual presencia y que se lleven a cabo las medidas adecuadas para evitar su eventual ingreso y posterior diseminación.

La presente memoria de título corresponde a parte de un estudio a nivel nacional que está realizando el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) para detectar la posible presencia de esta enfermedad y el riesgo potencial de la población ovina de nuestro país. De este modo, se pretende contribuir al conocimiento de la situación epidemiológica del scrapie en Chile y así servir como base para futuras investigaciones.

### 3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ANTECEDENTES

El scrapie o prurito lumbar es una enfermedad de los ovinos observada raramente como enfermedad natural de los caprinos. Pertenece al grupo de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), que corresponden a enfermedades degenerativas y progresivas del Sistema Nervioso Central (SNC), que se caracterizan por presentar un largo período de incubación y que finalmente terminan con la muerte del animal afectado (Davis y col., 1991).

Dentro de las EET, entre las que se clasifica el scrapie ovino, se encuentra la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE), la Encefalopatía Transmisible del visón (TME), la enfermedad del agotamiento crónico de los ciervos (CWD) que afecta a las mulas, alces y ciervos y la Encefalopatía Espongiforme Felina (FSE). A su vez el kurú, Creutzfeldt - Jakob (CJD), el síndrome de Gerstmann Straussler - Scheinker (GSS) y el Insomnio Familiar Fatal (FFI), afectan al humano. Actualmente se defiende la teoría que considera que las EET, son en realidad una misma enfermedad, con múltiples formas de presentación en distintas especies. Incluso hay evidencia experimental, que inóculos de hombres fallecidos por CJD, provocan en caprinos lesiones que no son posibles de diferenciar del scrapie adquirido en forma natural (DeArmond y Prusiner, 1995).

Datos históricos, indican que el scrapie es la enfermedad más antigua del grupo de las EET, ya que en Europa se describe desde hace más de 250 años y es la primera EET estudiada en relación a su transmisibilidad (ECA, 1994), reconociéndose como entidad clínica en Inglaterra en 1730. En la segunda mitad del 1800, se informó la enfermedad en Inglaterra, Alemania, España, Francia y luego al resto de Europa. La extensión del scrapie por todo el continente europeo, se atribuye a una importación de ovejas raza Merino desde España (Bendheim, 1993). Con posterioridad en 1936 en Francia, se demostró experimentalmente su carácter infeccioso con la reproducción experimental de la enfermedad, mediante la inyección intraocular en ovejas sanas de médula espinal procedente de una oveja enferma, constatándose el largo período de incubación de la enfermedad. En Canadá la enfermedad fue descrita por primera vez en

1938. En Inglaterra en 1939, se confirmó la transmisibilidad del agente causal, con la sospecha de que estaría implicado un agente de naturaleza viral. En EEUU se diagnosticó en 1947. A principios de los años cincuenta se hizo patente la naturaleza atípica del patógeno, por su extraordinaria resistencia a los agentes fisicoquímicos que normalmente inactivan a los virus. Australia y Nueva Zelandia lograron erradicar la enfermedad cuando esta apareció en los años cincuenta (Bendheim, 1993). En el año 1962 aún se le definía como un desorden genético de carácter autosomal recesivo. En esta época se constató la diferente susceptibilidad entre las distintas razas de ovejas a adquirir la enfermedad y en 1965 se establece el concepto de “barrera interespecífica” en la transmisión del scrapie. A partir de entonces, se puso en duda la existencia de un ácido nucleico específico proponiéndose la asociación del scrapie con una pequeña proteína básica que podría replicarse. Finalmente, se propuso la hipótesis del prion, partícula infecciosa de naturaleza proteica, como el agente etiológico de la enfermedad (Prusiner, 1995). Esta enfermedad ha sido diseminada prácticamente a nivel mundial, siendo descrita en India, Africa, Asia, América del Norte y del Sur, entre otros (Martín, 1988).

El scrapie es endémico en Europa y ha sido diseminado a todos los continentes por el traslado de animales durante el largo período de incubación. Países como Australia, Nueva Zelanda y Sudáfrica, tras realizar exigentes programas de erradicación, se declaran aparentemente libres de scrapie ovino, sin embargo debido a los fuertes intereses económicos que están en juego, en muchos casos queda en tela de juicio la “ausencia” de scrapie, ya que la enfermedad es tan temida que las ovejas sospechosas son sacrificadas y no se diagnostica la enfermedad, lo cual dificulta el reconocimiento y control de ella.

A pesar que en Chile se han establecido medidas para evitar su ingreso y no se ha diagnosticado la enfermedad, el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), se encuentra realizando un estudio poblacional a nivel nacional para detectar la eventual presencia de esta enfermedad (SAG, 1997) y el presente trabajo de memoria de Título, corresponde a una parte de este estudio.

La incidencia de scrapie es muy difícil de establecer. En Inglaterra y Gales se estima que es del orden de 0.5 - 1.1 casos de ovejas al año. La incidencia varía según las razas, pero aún en una misma raza hay fluctuaciones notables de un año a otro. En



algunos rebaños con varios cientos de ovejas, solamente aparecen uno o dos casos cada año, aunque en otros rebaños hasta la mitad de las ovejas mueren afectadas por la enfermedad, antes del final de su vida productiva prevista.

Las Tablas N° 1 y 2 muestran las fechas en que han sido informadas por primera vez las EET a nivel mundial, tanto en los animales como en el humano:

**TABLA N°1:**

**ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES EN ANIMALES**

ENFERMEDAD	INFORMADO POR PRIMERA VEZ:
<b>Scrapie:</b>	
Ovinos	1730
Caprinos	1872
<b>Encefalopatía transmisible del Visón</b>	1965
<b>Enfermedad del agotamiento crónico de los ciervos</b>	1967
<b>Encefalopatía espongiiforme bovina</b>	1986
<b>Encefalopatía espongiiforme felina:</b>	
Gato doméstico	1990
Puma	1992
Ocelote	1994
Tigre	1996

Referencia: (OIE), 1998.

**Tabla N°2:**

**ECEFALOPATIAS ESPONGIFORMES HUMANAS:**

ENFERMEDAD	INFORMADO POR PRIMERA VEZ:
<b>Enfermedad de Creutzfeldt – Jakob:</b>	
Esporádica	1921
Familiar	1924
Iatrogénica	1974
Nueva variante	1996
<b>Enfermedad de Gerstmann Straussler-Sheinker</b>	1928
<b>Kurú</b>	1955
<b>Insomnio familiar fatal</b>	1986

Referencia: (OIE), 1998.

### 3.2 ETIOLOGÍA

Durante muchos años se pensó que estas enfermedades neurodegenerativas eran producidas por un agente viral desconocido de acción lenta, incluyéndose dentro de los virus no clasificados. Sin embargo, en la actualidad se sabe que este agente corresponde a un prion (*proteinaceous infectious particle*) o partícula de proteína infecciosa (isoforma anormal de una proteína celular), distinta a los virus, ya que carece de ADN y por ende tiene la capacidad de replicarse sin genes, mostrando resistencia a los inactivantes de ácidos nucleicos, pudiendo adquirirse por herencia o por una infección. Se han utilizado muchas técnicas fisicoquímicas muy sensibles para buscar restos de ácidos nucleicos de origen viral en preparados purificados de priones dando resultados negativos (De Armond y Prusiner, 1995; Pizarro, 1998).

El “prion”, agente definido por Prusiner en 1984, es resistente a la actividad de las proteasas, a los agentes físicos como el calor, a los desinfectantes químicos, a las radiaciones ionizantes y ultravioleta (UV) de 254 nm. de longitud, a tratamientos con cationes bivalentes, a los iones metálico-quelantes, a tratamientos ácidos con pH 3 - 7, a hidroxilaminas, formalina en ebullición y otros. Se ha demostrado la gran resistencia del prion en el medio ambiente, ya que conserva su infectividad enterrado y mezclado con tierra por un período superior a tres años. Así es como la enfermedad ha reaparecido en campos contaminados aún varios años después de eliminadas las manadas infectadas. Sin embargo, se puede producir la inactivación de los priones mediante la digestión prolongada con proteasas, tratamientos con urea, álcalis a pH > 10, autoclave a 132°C durante más de 2 horas, el uso de solventes orgánicos, sustancias denaturalizantes (fenol) o agentes como el isocianato de guanidina (García, 1998; Torres, 1998). Pero debido a la

falta de información específica, no es posible garantizar que alguno de estos tratamientos en particular lo desactive totalmente, especialmente bajo las condiciones de extracción comercial (OIE, 1998).

En la actualidad los priones se conocen por un conjunto de características que se presentan a continuación, (Cohen y Prusiner, 1998):

- Invisibles al microscopio electrónico.
- 100 veces más pequeños y simples que los virus.
- Sólo están constituidos por proteínas.
- Glicoproteínas de peso molecular 30 KD. (PrP - PrP 27 - 30).  
(el agente del scrapie ovino posee una proteína específica que ha sido nominada como PrP 27 /30, es decir prion polipéptido 27 - 30 kD).
- Carecen de ADN o ARN.
- Se dividen en el interior de las células.
- Período de incubación largo y asintomático ( meses, años, décadas).
- Sintomatología clínica varía de semanas a años.
- Período de incubación y curso de la enfermedad son inmodificables por inmunosupresión o inmunopotenciación.
- Curso clínico fatal. Los cuadros clínicos son todos semejantes entre sí, iniciándose con dificultad para caminar debido a alteraciones del cerebro.
- Lesiones confinadas al SNC (procesos degenerativos).
- Ausencia de efecto citopático en células infectadas *in vitro*.
- Sistema inmune permanece intacto. Ausencia de respuesta humoral y celular (no hay fiebre y las células del líquido céfalo raquídeo permanecen normales). A pesar de ser un

antígeno débil, su inmunoreactividad aumenta significativamente con la denaturación (Torres, 1998).

- Resistente o sólo parcialmente inactivado a la mayoría de los procedimientos que modifican a los ácidos nucleicos (formalina, glutaraldehído, proteasas, alcohol, radiaciones UV e ionizantes).

### 3.3 PATOGENIA

Existen varias vías posibles de transmisión natural de los priones:

- La vía digestiva, mediante el consumo de carne y vísceras de animales infectados o por la práctica del canibalismo, como en el caso del kurú.
- La vía respiratoria, por secreciones bronquiales y nasales.
- La vía cutánea, por heridas y abrasiones.
- Transplantes de córnea y cirugía, en la transmisión interhumano del CJD.
- Vía transplacentaria y por secreciones post-parto.

La infección natural es de la madre a su cría, en el período que media desde el parto al destete e incluso prenatal, especialmente cuando la cría está en áreas confinadas. Las membranas se reconocen como una posible fuente de infección. Así, correspondería a una infección horizontal, pero con una predisposición genética por parte del huésped (Detwiler, 1992). Esto es válido para ovejas, cabras y bovinos. Por otra parte, se ha determinado que la presencia de un aminoácido particular, en una secuencia de 230 aminoácidos determinaría la resistencia o susceptibilidad de las ovejas al scrapie. Así, cambios de la secuencia aminoacídica en la posición 136, se asocian con una mayor o menor posibilidad a adquirir la enfermedad. Ovejas con presencia del aminoácido alanina en esta posición, serían más resistentes a la infección. En bovinos, la posición 171 de la glutamina determina que el individuo sea más propenso a adquirir BSE, en cambio la presencia del aminoácido arginina, que el animal sea más resistente (Detwiler, 1992).

El prion se formaría a partir de una proteína PrP de membrana, que poseen normalmente las neuronas, designada como PrP<sup>c</sup>, que por una modificación post traduccional del ARN mensajero sufre un cambio conformacional, que se evidencia como una transformación de sus cadenas  $\alpha$  en  $\beta$  y adquiere una mayor resistencia a la digestión por proteasas y además, la capacidad de unirse formando fibrillas, que al acumularse en el tejido nervioso producen los signos y síntomas de esta enfermedad (Pan y col., 1993). De este modo, la PrP<sup>c</sup> con un 3 % de cadenas  $\beta$  y un 42 % de cadenas  $\alpha$ , se transforma aumentando a un 43 % de cadenas  $\beta$  v/s un 30 % de cadenas  $\alpha$ , posterior al cambio postraduccional. El gen del prion es transcrito a su ARN mensajero, el cual migra hacia el lugar donde induce la transducción de la proteína del prion. En células sanas, el prion codificado sufriría estas modificaciones postraduccionales antes de localizarse en la membrana. En células infectadas, uno o más de estos pasos es anormal resultando en el acúmulo de la proteína alterada dentro y fuera de las células. El cambio post traduccional ocurriría debido a la presencia de la proteína prion exógena o por una mutación en el gen que codifica a la proteína prion, como en el caso de las enfermedades GSS y FFI (De Armond y Prusiner, 1995).

La propagación de la proteína anormal designada como PrP<sup>sc</sup> en el tejido nervioso, ocurre cuando una PrP<sup>sc</sup> exógena se une a una PrP<sup>c</sup> formando un complejo, que origina dos PrP<sup>sc</sup> y éstas a su vez van formando otros complejos que finalmente se acumulan en el interior de la neurona. Este acúmulo intracelular se relaciona con las lesiones morfológicas observadas en el tejido nervioso. Así se van formando verdaderas fibras proteicas conocidas como fibras asociadas a scrapie (SAF) (scrapie asociated fibrils) (Pan y col., 1993). Estas inducen un daño neuronal y la activación de la glía. Las SAF se



depositan en el intersticio del tejido nervioso y corresponden a formas fibrilares de la PrPc 27-30 (Detwiler, 1992). Estas estructuras filamentosas pueden medir 10 a 20 nm de diámetro y 100 a 200 nm de largo. Las fibrillas SAF son lisas y rectas, muy semejantes a listones y raramente aparecen retorcidas (Torres, 1988). Su detección puede constituir una importante ayuda diagnóstica. Es así como en extractos de material infeccioso sometido a la acción de enzimas proteolíticas, se pueden observar las fibras mediante microscopía electrónica. Han sido detectadas en todas las EET y están directamente asociadas a la infectividad del prion (Detwiler, 1992).

Es fundamental que el huésped produzca la PrPc para que se pueda manifestar la enfermedad. Además, debe existir una homología en los residuos centrales de la estructura proteica de los priones, tanto de la PrPc como de la PrPsc exógena, para provocar la transformación conformacional y por ende la enfermedad (De Armond y Prusiner, 1995).

De esta manera, ambas proteínas PrPc y PrPsc, tienen los mismos aminoácidos pero difieren en la conformación, es decir, en la forma en que se ordenan espacialmente, siendo este hecho lo que determina la patogenicidad del prion. Este cambio conformacional post-traducciona no genera la aparición de nuevos epítopes, lo que explicaría la ausencia de una respuesta inmune del hospedador frente a los priones (Stahl y col., 1993). Por otra parte, la existencia de la proteína PrPc normal en las neuronas del huésped, permite suponer que esta es antigénicamente muy similar a la proteína alterada, lo que también explicaría, la falta de la reacción inmunológica e inflamatoria.

La reproducción de los priones en el huésped sigue una ruta determinada. Los priones se replican primero en el bazo y otras células retículo endoteliales y más tarde en el cerebro. Una posibilidad es que lo hagan a través de una pequeña porción de ADN, lo

cual no explica la síntesis de todas las grandes y complejas proteínas del prion. La otra posibilidad es que el gen que comanda la síntesis de los priones no sea transportado por el mismo, sino que estaría en las células de los mamíferos (gen PRNP). Así la infección que desata el prion activaría al gen que normalmente existe en las células. De esta forma si el prion tuviera una pequeña cantidad de ADN propio, esta podría gatillar la activación del gen de la propia célula, insertándose en el cromosoma de la célula huésped y desde ahí se sintetizaría la proteína del prion. Esto no constituiría una verdadera replicación del prion (multiplicación), sino mas bien una amplificación de él. Por lo tanto, la sustancia amiloide que se acumula en el cerebro de los animales afectados, sería una acumulación de proteínas de priones producidos por la misma célula (De Armond y Prusiner, 1995).

El agente puede entrar vía oral y luego dado la resistencia de los priones, puede sobrevivir en el tracto digestivo sin degradarse. Cuando alcanza las placas de Peyer del intestino delgado (íleon), la proteína infecciosa es captada y pasa al interior del organismo, donde a través de las fibras postganglionares alcanza el ganglio linfático celíaco y poco después, por medio de las fibras preganglionares llega al tronco simpático. Una vez en el tejido linfático puede replicarse, ocurriendo lo mismo en las fibras nerviosas simpáticas que inervan estos tejidos (García, 1998; Wells y col., 1998).

Los priones continúan su camino centrípeto hacia el SNC, donde se replican en la médula espinal hasta alcanzar el tronco encefálico, cerebelo y cerebro. La velocidad en que avanzan a lo largo de las fibras nerviosas es de 0.5 a 1 nm. al día, velocidad semejante al transporte axoplásmico lento, pero es sumamente lenta si se compara con la velocidad de los virus neurotrópicos típicos como herpes o rabdovirus, que también utilizan el transporte axoplásmico, pero a una velocidad de 50 a 250 nm al día (García, 1998).

En bovinos, algunos estudios demuestran que hay presencia de infecciosidad en el tercio distal del íleon, 18 meses post inoculación experimental. También se ha demostrado infecciosidad en el sistema nervioso periférico, en los ganglios cervicales y en la raíz dorsal del cordón torácico, a los 32 y 40 meses post inoculación (Wells y col., 1998). Experimentalmente se han descrito alteraciones a nivel pancreático en hamster infectados con scrapie (Ye y col., 1994).

Luego de infectar a la neurona, la PrPsc se ubicaría en la membrana celular y sus inmediaciones, adyacente al neuropilo y asociada con el espacio extracelular, siendo como ya se mencionó, el acumulo intracelular de ella el responsable de la patogénesis de las EET. La agregación de la PrPsc en la neurona y su alrededor (neuropilo), llevaría a la formación de SAF, asociado con un aumento de la microglía y liberación de citoquinas como ocurre en el caso de la enfermedad de Alzheimer en humanos (Jeffrey y col., 1997).

La degeneración del axón terminal junto con el acúmulo de la PrPsc se realiza de un modo muy específico. Se afectan las estructuras presinápticas de determinados núcleos, lo que sugiere la existencia de un mecanismo o receptor específico presente en un determinado grupo de neuronas. El hecho de que no todas las neuronas sean afectadas, sugiere la existencia de un mecanismo adicional a la exposición de la PrPc en la membrana celular, que involucraría perturbaciones en los neurotransmisores o a nivel de receptores (Jeffrey y col., 1997), afirmándose la teoría de que existen regiones cerebrales más vulnerables al acúmulo de la PrPsc que otras, semejante a lo ocurrido en la FFI.

La muerte neuronal ocurriría por un aumento del calcio intracelular, por la activación de los receptores n-metil-di-aspartato (NMDA) directa o indirectamente por

parte de la PrPsc. Esto porque “*in vitro*” se ha logrado el bloqueo de la muerte de la célula nerviosa con antagonistas del N-metildiaspartato (NMDA) (Jeffrey y col., 1997).

### 3.4 CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS PRIONES:

Cabe destacar las siguientes características conocidas de los priones (De Armond y Prusiner, 1995; Torres, 1998).

- La PrPsc es codificada por un gen cromosómico y no por un ácido nucleico presente en la partícula del prion.
- El producto normal del gen es una proteína de 33 - 35 KD (PrPc) que corresponde a una proteína de membrana sensible a proteasas, mientras que la proteína prion de 27 - 30 KD (PrPsc) es resistente.
- Las secuencias aminoacídicas de la PrPsc y de la PrPc son iguales. Estas se han establecido mediante técnicas de secuenciación de proteínas y espectrometría de masa.
- En la proteína PrPc se rompe un fragmento de 67 aminoácidos del amino terminal para dar lugar a la PrPsc cuando es sometida a la acción de proteasas.
- La dosis infectante (ID50) de PrPsc purificada es de 100.000 moléculas de PrPsc.

El gen PRNP determina los aminoácidos que tendrá la proteína del prion, por lo tanto, dentro de una misma especie animal habrán distintas cepas de priones. De acuerdo a Pizarro (1998), estas se diferencian entre sí por:

- El largo del tiempo de incubación, definido como el tiempo que media entre la infección con la PrPsc y la manifestación clínica de la enfermedad (18 a 60 meses).
- La zona del SNC donde se acumulan las PrPsc.
- La manifestación de los signos clínicos.

La susceptibilidad para adquirir la enfermedad se relaciona con la presencia del gen PrP propio del huésped, que está presente en ovejas infectadas en forma natural (Hunter y col., 1992).

Se cree que existe una asociación entre la BSE y el scrapie a través de la alimentación de bovinos con harina de carne y hueso de origen ovino, cuyo proceso de

elaboración inactivaría sólo en forma parcial al agente de scrapie, constituyendo este hecho un factor primordial en la aparición de BSE (Bendheim, 1993). La exposición efectiva de la población bovina comenzó en el período 1981 - 1982 en el Reino Unido continuando hasta los años 1984 - 1985. Así, en estos años ocurrieron básicamente cambios en el procesamiento del alimento concentrado de animales, para aumentar la eficiencia de los procesos continuos y una reducción del uso de solventes para la extracción de grasas, en las harinas de carne y hueso. Las temperaturas alcanzadas en los procesos de tratamientos, con presiones atmosféricas normales, no garantizan la total eliminación del agente del scrapie ovino, pudiendo ser adecuadas para desinfectar los niveles más bajos de contaminación. Los cambios en los procesos del tratamiento, permitieron la sobrevivencia de una tasa de infección adecuada para provocar la infección en bovinos. Durante el período 1972 - 1988, declinó en forma abrupta el uso de la extracción de disolventes en las harinas de carne y hueso, para aumentar la producción de grasa animal. La proporción de harina de carne y hueso obtenida con solventes disminuyó en un 50 % entre 1980 y 1983, concordando estos años con el comienzo previsto de la exposición a la enfermedad en bovinos. El abandono de la extracción por solventes, significó la desaparición de dos pasos que actúan en la desactivación parcial del agente del scrapie (Kimberlin, 1992; Wilesmith, 1994). Estos pasos se refieren en primer lugar, a las condiciones de extracción mediante 8 horas con un solvente a 70°C, que disminuiría la infecciosidad y/o transformaría la infecciosidad residual en más termosensible. Luego, la aplicación directa de vapor a alta temperatura por 15 a 39 minutos para eliminar los residuos del solvente, continuaría ayudando a eliminar la infecciosidad del agente de scrapie (Kimberlin, 1992). El grado de inactivación por la exposición a solventes con altas temperaturas y luego sometidos a un golpe de secado, es bajo y básicamente se debe al secado. Se sugiere que la suspensión de la extracción de grasa por solventes en conjunto con otros factores, podría haber jugado un importante rol en la aparición de BSE, a pesar de no tener tanta injerencia en la reducción de los títulos de infecciosidad (Taylor y col., 1998).

De esta forma el ganado vacuno siempre habría sido susceptible al agente de la enfermedad ovina, pero no había sido expuesto suficientemente como para que se produjera la enfermedad (Wilesmith, 1994). Esto, debido a que el “reciclado” del agente

etiológico de scrapie a través de la elaboración de alimentos para bovinos, produjo el equivalente a un pasaje serial de la infección, favoreciendo la selección de “cepas” que se habrían adaptado al ganado vacuno, siendo estas distintas a las presentes en ovinos (Kimberlin, 1992).

### 3.5 SALUD PÚBLICA

En relación a la enfermedad Creutzfeldt - Jakob en el 10 a 15 % de los casos se trata de una enfermedad hereditaria provocada por una mutación en el gen PrP de las células germinales. Por otra parte, se ha estudiado intensamente la posibilidad que esta enfermedad sea ocasionada por una exposición ocasional al scrapie (ECA, 1994). Se sabe que el agente causal tendría un patrón conformacional distinto en las distintas especies de animales a las que afecta, entonces podría existir un cambio en la conformación del prion que permitiría la transmisión interespecies. De las dos isoformas del prion, PrPc y PrPsc, la isoforma PrPc ha sido descubierta en tejidos mamíferos como ovinos, bovinos, hámster, ratón, visón y en humanos, con un 80 a 90 % de homología entre las distintas especies. Se acepta que la secuencia de la proteína PrPc determina que haya una barrera interespecies para las EET. En el caso de la isoforma bovina, esta puede haber sido superada por el agente causal del scrapie. En efecto, la secuenciación de los genes de los priones del ovino y bovino dejan ver una homología del 98 % entre ambas proteínas, lo cual permite explicar el pasaje de la barrera entre las especies. En relación a la nueva variante CJD (nvCJD) en humanos, se ha visto que los afectados tendrían el genotipo metionina-metionina (MM) en el codón 129, siendo muy distinto a los casos de CJD esporádica. En relación a lo anterior, se piensa que la capacidad de transmisión de una enfermedad priónica entre diferentes especies, la determinaría la homología de los residuos centrales de las estructuras del prion (incluyendo al residuo 129). Así, si siempre el PrPsc bovino es homocigoto para metionina en su equivalente al codón 129 del humano, el genotipo MM del hombre tendría una mayor sensibilidad a los priones bovinos, que los no MM (OIE, 1998). En 1995, en Inglaterra murieron dos adolescentes con los síntomas de la enfermedad CJD. Desde entonces, han muerto muchas personas por lo que actualmente se conoce como la nueva variante CJD (nvCJD), cuyo agente transmisible parece ser indistinguible del agente de la BSE. En marzo de 1996, se notificaron 10 casos de la nueva variante de CJD en el Reino Unido, relacionándose por su signología y fenotipo clínico patológico con la BSE, que a su vez se relaciona con la presencia de scrapie en ésta región (OIE, 1998). De Octubre de 1996 a la fecha, se han



registrado 111 casos de nv CJD en el Reino Unido, 3 en Francia y 1 en la República de Irlanda.(ANONc).

### **3.6 EPIDEMIOLOGÍA**

Se sabe que el scrapie ovino es endémico en el Reino Unido desde hace muchos años y a la vez en este país existe una importante población de ovejas, lo cual favoreció la exposición continua del ganado vacuno a este agente a través del consumo de harina de carne y hueso de origen ovino. Este hecho hizo inevitable que la epidemia se ampliara por el constante reciclado del agente etiológico, lo que produjo el equivalente a un pasaje seriado de la infección. De este modo, se favoreció la selección de “cepas” del agente del scrapie distintas a las originalmente presentes en el ganado ovino y perfectamente adaptadas a los bovinos (Kimberlin, 1992)

Se piensa que el agente causal del scrapie se puede transmitir, tanto a la propia descendencia de la oveja afectada como a otros corderos de un mismo rebaño, a través del contacto con la placenta y otros fluidos. Los síntomas de la enfermedad aparecen normalmente entre los 2 y 5 años de edad. Las ovejas pueden vivir entre 1 y 6 meses después de la aparición de los signos clínicos, pero la muerte es inevitable. Sin embargo, aún falta mucho por conocer acerca de la exacta epidemiología y patogénesis de la enfermedad (Dawson y col., 1998). Se piensa que la gran resistencia a la inactivación del prion y su resistencia en el medio ambiente, constituyen un factor muy importante en la epidemiología del cuadro.

### 3.7 PERÍODO DE INCUBACIÓN

En relación a los períodos de incubación, la de mayor extensión dentro de las EET corresponde al scrapie que va de 2 a 5 años. A pesar de que la causa del scrapie reside en un agente infeccioso, existe un gen específico llamado “sip” (scrapie incubation period), que ejerce una influencia capital sobre la duración del período de incubación de la enfermedad. El mismo gen parece ser el responsable de la mayor o menor susceptibilidad de los animales a adquirir esta enfermedad. El gen sip tiene 2 alelos (sA y pA) que producen 3 diferentes genotipos para esta patología (Detwiler, 1992). Es así como en ovinos de raza Cheviot y Swaledale, se ha visto que individuos con alelos determinantes de cortos tiempos de incubación desarrollan scrapie entre los 2 a 5 años de edad, mientras que los que poseen alelos que determinan largos períodos de incubación mueren antes por causas naturales que por scrapie. Las características genéticas tienen en consecuencia una gran importancia en el desarrollo de la enfermedad en los ovinos, no así en los caprinos.

Por otra parte, el tiempo de incubación entre la infección primaria y la aparición de los signos clínicos es cercano al año y puede incluso exceder la vida productiva de las ovejas (más de 8 años), existiendo animales que no alcanzan a desarrollar los signos, los que pueden participar como propagadores de la infección (Bendheim, 1993), siendo ésta la razón de su aparente resistencia.

En relación a la transmisión experimental, el pasaje de los priones a animales de laboratorio varía y el período de incubación se acorta significativamente. La transmisión experimental se efectúa mediante la inoculación de material infeccioso (cerebro). Los tejidos de pacientes humanos muertos por CJD producen lesiones en caprinos, que no son posibles de diferenciar de aquellas que produce el scrapie en esta especie animal (Prusiner, 1984). También provoca lesiones en gatos. Al ser inoculado en bovinos produce las lesiones típicas de la BSE (Cutlip y col., 1996).

Se conocen muchos detalles del scrapie experimental en ratones y hamsters. En la infección experimental en ovinos se confirma lo ocurrido en la patogenia natural. Si el material infeccioso se inoculara en forma intracerebral, afecta directamente al encéfalo y el período de incubación es en general corto. Si la infección es por vía periférica (oral,

percutánea, intravenosa o intraperitoneal), el agente se multiplica principalmente en el bazo durante un tiempo prolongado. También lo hace en ganglios linfáticos, tonsilas, intestino, glándulas salivales y timo. Después de la replicación, el agente migra a través de los axones de los nervios viscerales autonómicos. La infección del SNC se detecta primero en el segmento torácico de la médula espinal. De ahí migra en dirección craneal y caudal a una velocidad de 0.5 a 1 nm al día, siendo esta migración mucho más lenta que lo observado en virus convencionales como rabia o herpes virus. Llegado al encéfalo, la diseminación del prion continúa lentamente hacia adelante a partir del bulbo raquídeo (Cubillos y Gimeno, 1991).

### **3.8 DIAGNÓSTICO**

En relación al diagnóstico del scrapie, es fundamental asociar el examen clínico con el análisis histopatológico del encéfalo. Esta es una entidad subaguda cuyas lesiones son microscópicas, están restringidas al SNC y son muy similares en cabras y ovejas (Wood y Done, 1992).

El curso de los signos clínicos varía de 1 a 8 meses, pudiendo extenderse algo más según el individuo. Algunas ovejas afectadas pueden mostrar como único signo clínico un leve prurito y morir en forma tan rápida que la enfermedad no es reconocida en rebaños bien controlados. La sintomatología va desde un aumento en la excitabilidad e incluso hipersensibilidad hasta la demencia, con temblores de cabeza y cuello. La progresión de los signos también puede ser lenta, incluyendo prurito, pérdida de lana, rápidos movimientos de cabeza y hocico, bruxismo, pérdida de peso corporal y debilidad. Además de la alteración del estado mental con comportamiento agresivo, existe incoordinación locomotora observada usualmente como ataxia al andar, temblores musculares y disturbios sensoriales frecuentes con una exagerada respuesta a los estímulos externos. A medida que evoluciona la enfermedad, el caminar se torna atáxico siendo algunos animales incapaces de pararse o caminar sin caerse, para luego con el transcurso de las semanas iniciar un intenso prurito, que obliga a los animales a rascarse y morderse específicamente la zona caudal y dorso lumbar.

Las manifestaciones más tardías incluyen marcada pérdida de peso, sed, intolerancia al frío, amplias fluctuaciones de temperatura corporal y anormalidades en la frecuencia y ritmo cardíaco. Algunas ovejas afectadas comienzan a engordar. Probablemente estos signos reflejan un compromiso hipotalámico o de la hipófisis

posterior. Es raro encontrar disturbios visuales, convulsiones o parálisis de los miembros posteriores (Bendheim, 1993).

De esta manera, el signo clínico más importante en el scrapie ovino adquirido en forma natural, es morderse y restregarse en respuesta a la intensa picazón y la incoordinación al andar (Linnabary y Hall, 1991). La patogénesis del prurito es desconocida. No existen estudios a cerca de si su fisiopatología obedece a un prurito dérmico o a una manifestación del sistema nervioso central o periférico. La triada prurito, ataxia y debilidad general, se podría considerar como diagnóstico clínico, aunque la presencia de éstos tres signos juntos no ocurre en todos los casos. La ataxia y la inestabilidad postural, podrían reflejar un compromiso cerebelar y de estructuras espino-vestibulares.

La duración clínica de la enfermedad natural es generalmente inferior a 4 meses, afectando animales entre 2 a 5 años como promedio (Detwiler, 1992). La ataxia y la inestabilidad postural, reflejan el compromiso cerebelar y de estructuras espinovestibulares (Bendeheim, 1993).

El principal método diagnóstico es post mortem, mediante el examen histológico del encéfalo (ECA, 1994). Las lesiones histopatológicas que se observan en el SNC son la base para el diagnóstico positivo, ya que son muy típicas y mientras más prolongado sea el curso clínico más se desarrollan. Dentro de ellas, es muy común observar la vacuolización del pericarion neuronal, a pesar que en ovejas sanas también se puede encontrar, pero nunca en forma simétrica y bilateral como es el caso de esta patología. El hallazgo histopatológico de vacuolización en esta disposición es suficientemente específico como diagnóstico, especialmente al valorar el grado y la distribución de las lesiones conjuntamente con los síntomas externos (Wells y Mc Gill, 1992). La

vacuolización del citoplasma neuronal es una de las características más marcadas y patognomónicas, siendo particularmente evidente tanto en el pedúnculo cerebelar, como en los cuernos ventrales y laterales de la médula espinal (Detwiler, 1992). Otras lesiones histopatológicas neuronales son la degeneración, el recogimiento del cuerpo celular, el aumento de la basofilia en la tinción y la compresión de la sustancia de nissl y de neofibrillas secundarias a la presencia de vacuolas. Como consecuencia de estas lesiones, es posible ver necrosis en las células neuronales. Las anomalías encontradas se encuentran principalmente en el cerebelo, en sus conexiones aferentes y en el eje hipotálamo - hipófisis (Bendheim, 1993).

En el scrapie puede encontrarse vacuolización neuronal en todo el tronco encefálico y médula espinal, siendo más abundante en la formación reticular y en los núcleos medial vestibular, lateral cuneado y papiliformes. Puede afectar pocas neuronas, sin embargo su compromiso aumenta caudalmente desde el cerebro medio hacia la médula oblongada. También se encuentran vacuolas en los ganglios paravertebrales, pero este hallazgo presenta una incidencia igual en ovinos sanos. La corteza encefálica no se altera, así la degeneración neuronal afecta a los núcleos mesencefálicos, cerebelosos profundos y de la médula oblongada. La distribución de las masa nucleares afectadas podría ser variable e inespecífica. En la médula espinal, la degeneración neuronal afecta principalmente al núcleo intermedio lateral. Generalmente las neuronas motoras no se afectan, lo cual concuerda con el hecho de que no hay degeneración muscular en esta enfermedad (Jubb y col., 1995).

Además se presentan cambios espongiiformes en el neuropilo de la sustancia gris, que consisten en una dilatación de los procesos neuronales y en vacuolizaciones tanto del citoplasma neuronal como de la astroglia, donde ocurre un aumento de tamaño de los

procesos astrocitales, dilatación de los espacios periaxoniales y ruptura de las vainas de mielina. También se ha visto la presencia de placas amiloides alrededor de vasos sanguíneos o “amiloidosis cerebro vascular”, las que son muy difíciles de encontrar en animales experimentales. La disposición cerebral de la amiloidosis no es una característica fácil de describir, pero actualmente se le está dando mayor atención a su importancia para el conocimiento de la patogénesis de la enfermedad. Las placas amiloides tienden a depositarse entre el neuropilo y área perivascular y subependimal (Bendheim, 1993). Así tendríamos una degeneración y pérdida neuronal, gliosis (principalmente por una reacción astrocitaria) y amiloidosis, destacando siempre la distribución simétrica y bilateral de las lesiones. Por otra parte, se producen cambios degenerativos primarios en la sustancia blanca, como espongiosis, que a su vez es secundaria a los cambios degenerativos neuronales como la presencia de vacuolas en la sustancia gris, que no es exclusivo para esta especie ya que también se presenta en bovinos, porcinos y felinos, pero sin embargo, se considera lo más característico de esta patología (Wells y Mc Gill, 1992).

La topografía general de las lesiones es la misma en ovinos y en caprinos, pero la severidad de la presentación varía mucho entre los individuos. Los núcleos talámicos incluyendo el cuerpo geniculado lateral, parecen ser los primeros y más severamente afectados por la degeneración y pérdida neuronal. La astrogliosis ocurre especialmente en el mesencéfalo y su intensidad disminuye caudalmente, excepto en la corteza cerebelosa. La astrogliosis, en el estrato granular del cerebelo destaca durante el curso tardío de la enfermedad, mientras que la vacuolización del neuropilo en la sustancia gris del cerebro medio y la médula oblongada, es muy escasa y su demostración requiere una fijación cuidadosa (Jubb y col., 1995).



Los manguitos perivasculares no son parte de este cuadro, pero pueden observarse ocasionalmente algunos pequeños manguitos linfocíticos, considerando que en ovinos sanos son comunes los vasos medulares con manguitos, especialmente en el área postrema (Jubb y col., 1995).

Otro método diagnóstico corresponde a la detección del prion PrP, mediante “inmunotransferencia” o por “inmunohistoquímica”, que son aceptados como un criterio molecular para el diagnóstico de la enfermedad. El acúmulo anormal de PrP puede detectarse luego de su purificación parcial, mediante el uso de detergentes en extractos de los cerebros afectados. La modificación de las proteínas puede ser demostrada al observar en forma anómala, las fibras de naturaleza proteica mediante microscopía electrónica (Wells y McGill, 1992). Así, se puede realizar la identificación de las SAF en el SNC, mediante 3 métodos principalmente:

- Microscopía electrónica (morfología).
- Los preparados purificados de SAF, que pueden analizarse por medio de inmunotransferencia (western blot) después de realizar una electroforesis en gel de poliacrilamida. Esto permite detectar la PrPsc, que se distingue por su resistencia a la digestión de proteasas si se compara con la proteína PrPc normal.
- La proteína del prion, puede detectarse en secciones de cerebros por una reacción inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos contra las SAF (Kimberlin, 1992).

En relación a la determinación del prion, se sabe que es posible la transmisión a roedores de laboratorio, usando tejidos infectados pero se requiere un período de incubación de 1 a 2 años, por lo cual esto no constituye un método diagnóstico definitivo.

Por otra parte, no se ha detectado una respuesta inmune del agente de scrapie, por lo que no se utilizan pruebas serológicas (Bendheim, 1993).

Existen otras técnicas diagnósticas para detectar PrPsc, tales como la tinción inmunohistoquímica de tejido tonsilar (Schreuder y col., 1998), la medición de la enolasa específica neuronal, extracción de PrPsc y detección de una proteína (distinta a la PrPsc) en el líquido cefalorraquídeo de humanos y animales afectados por una EET, lo cual está en estudio, así como también, la utilización de isoformas de la proteína PrP resistentes a proteasas presentes en la orina, para detectar casos positivos de la enfermedad en la fase clínica de ésta (ANONa, 2001).

Estudios realizados hasta ahora, demuestran que existe una gran concordancia entre los resultados obtenidos por métodos de histopatología y la detección de la proteína fibrilar alterada. Sin embargo, aún falta mucho por investigar en relación al scrapie ovino y caprino, pues aún no se ha desarrollado una prueba diagnóstica que sea rápida *in vivo* y de uso comercial masivo, previo a la aparición de los signos clínicos, ni tampoco una vacuna.

En la actualidad existen pruebas rápidas como la inmunotransferencia que permite obtener resultados dentro de las 24 horas a partir de muestras de tejido nervioso, así como las pruebas de ELISA que son ejecutables incluso en menor tiempo. El test rápido de la empresa Prionics-Check, permite detectar el agente previo a la aparición de los signos clínicos. Los test rápidos se utilizan en los países que presentan en forma endémica la enfermedad, para pesquisar la proteína anormal o prion en los animales comerciales, antes de ir a consumo humano (RMB, 2001).tardío

### 3.9 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Es muy importante poder realizar un buen diagnóstico clínico ante la sospecha de esta enfermedad. El signo más característico del scrapie ovino o prurito lumbar es, como su nombre lo indica, la picazón que afecta a los individuos, la cual puede confundirse con la producida por la presencia de ectoparásitos entre los que se incluyen a los insectos como piojos, ácaros, garrapatas, moscas (moscarda azul en Inglaterra). Para diferenciarlos es muy importante tener en cuenta el registro de los programas sanitarios, así como la práctica de baños de inmersión, la presencia de parásitos externos en la región y el correcto examen clínico del animal (Cooper y Thomas, 1978).

Por otra parte, se deben tener en cuenta las parasitosis internas como las tenias, nemátodos o céstodos, que pueden llegar a afectar el sistema nervioso, así como también la distomatosis que en su etapa crónica puede provocar un cuadro de hepatotoxicidad, con la consiguiente signología nerviosa. Además es posible encontrar signos nerviosos en enterotoxemias clostridiales, por la producción de toxinas altamente nocivas que pueden causar una muerte rápida, similar a lo que ocurre en algunos casos de ovejas muertas por scrapie, ante lo cual el examen histopatológico es de suma importancia (Cooper y Thomas, 1978).

Otro diagnóstico diferencial del scrapie corresponde a la “enfermedad del salto” o “Louping-ill”, que es una patología de mucha importancia económica en Inglaterra, ya que afecta a varios animales de un rebaño. Es producida por un Flavivirus y transmitida por el vector *Ixodes ricinus*, en la cual los animales desarrollan una infección leve de la sangre llegando a alterar el sistema nervioso, con la consecuente muerte del animal. Afecta preferentemente a ovejas mayores (Cooper y Thomas, 1978).

También es importante tener en cuenta como diagnóstico diferencial a un grupo de enfermedades muy comunes en producción animal que generan trastornos de tipo nervioso, que corresponden a las alteraciones metabólicas, que se producen por anomalías en el funcionamiento normal del organismo y que en general están relacionadas con falta, escasez o aumento excesivo, de algún constituyente metabólico, dentro de las que se encuentran la hipocalcemia posparto, la carencia de cobre, la cetosis y la hipomagnesemia.

Se debe considerar además la listeriosis y la rabia por su signología clínica y otras como las encefalopatías de origen hepático o renal, la poliencéfalomalacia, la intoxicación con hexaclorofeno, las meningitis en general, la necrosis cortical cerebral y los tumores cerebrales (Davis y col., 1991; García, 1998).

Lo importante es tener en cuenta que a pesar que existe una amplia gama de patologías con signología nerviosa, el diagnóstico certero de cualquier enfermedad degenerativa del SNC es a nivel histopatológico, dentro de los cuales sólo en el caso del scrapie existiría un cuadro esponjiforme simétrico y bilateral a nivel encefálico.

### **3.10 CONTROL DE LA ENFERMEDAD**

El control del scrapie en los países en que está presente puede resultar dificultoso. Cabe recordar que su presencia se relaciona con rebaños cuyos patrones genéticos determinan la presencia del gen PrP y que la mantención de la infección se realiza por medio de la transmisión de las madres a sus crías. Así, en los programas de control es importante la selección del carnero reproductor y la higiene de las maternidades (Dawson y col., 1998), aunque el control genético se considera impreciso ya que los genotipos resistentes a una cepa del agente causal pueden ser susceptibles a otra cepa diferente.

De este modo, las bases de un programa de control y la eventual eliminación del scrapie, se basan en una selección genética utilizando progenitores resistentes a adquirir la enfermedad, mediante pruebas de pro genie (Bendheim, 1993), sin embargo, esto puede resultar en un alto precio en relación a tiempo y trabajo (Martin, 1998).

Se ha demostrado mediante técnicas de inmunofluorescencia, la presencia de autoanticuerpos heterogénicos contra las proteínas de los neurofilamentos en el suero de ovejas con scrapie y en algunos animales de laboratorio infectados con el agente causal y con filtrados de cerebros de CJD humano, por lo tanto está en estudio su utilización como posible medida terapéutica. Hasta este momento no existiría tratamiento efectivo contra las EET ovina y bovina, por lo que como estrategia de control se recomienda el beneficio y destrucción de los ejemplares enfermos. Mientras que en los países donde se alimentan animales con concentrados debe asegurarse que no contengan harina de carne, sangre o huesos de animales como los ovinos (ANONb, 2001).

La experiencia en países afectados por EET indica que la denuncia, faena obligatoria y eliminación del ganado, además de la prohibición del uso de proteína animal como alimento para rumiantes, no son por sí solas, suficientes para controlar un brote. Así es como en Argentina por ejemplo, se recomienda la aplicación de una o más de las siguientes medidas de control (CCCAEEB., 1997).

- **Habilitación de plantas productoras de harina de carne y hueso para uso como alimento animal, con métodos de procesamiento (tamaño de partícula, tiempo, temperatura y presión), que en forma experimental hayan demostrado ser efectivos para reducir el título de infección de scrapie y BSE.**
- **Determinación y uso de un método confiable para detectar la proteína de origen animal en el alimento para rumiantes.**
- **Implementación de un sistema para revisar los controles de las importaciones en base a información científica avanzada, observando las recomendaciones del código internacional de la OIE sobre salud animal.**
- **Evaluar la posibilidad de habilitar plantas productoras de alimento animal específica para rumiantes o no rumiantes, a fin de eliminar el riesgo de una contaminación cruzada de dietas de rumiantes con las de no rumiantes que podrían contener harinas de carne y hueso.**
- **Apoyo a la detección de EET en humanos, como CJD, nvCJD, GSS, FFI, principalmente. Para lo que se debe efectuar un examen neuropatológico de todo caso sospecho y los resultados ser publicados anualmente para lo que debieran asignarse recursos económicos para una adecuada vigilancia e investigación, mediante la creación de un centro de referencia para investigación y neuropatologías, que consta con:**

- Biopsias y/o autopsias.
- Estudios inmunohistoquímicos de PrP.
- Estudios bioquímicos de PrP, electroforesis en gel e inmunotransferencias.
- Desarrollo de un banco de ADN para ensayos de genética molecular.
- Implementación de un programa de capacitación para el diagnóstico clínico y patológico de EET en humanos. Esto mediante reuniones periódicas para médicos clínicos y patólogos con el fin de ver la posibilidad de la utilización de métodos diagnósticos más modernos.
- Creación de un registro central para casos de EET en humanos, con el envío anual de los datos obtenidos a la OMS.
- Debiera evaluarse la implementación de políticas de importación para animales vivos y embriones de especies rumiantes basadas en períodos de cuarentena, permitiendo un mejoramiento genético de los animales en el país importador, pero con un mínimo riesgo de importar alguna EET. (La necesidad y duración del período de cuarentena, dependería de la condición del país de origen) (CCCAEEB, 1997).

Es importante que cada país integre información básica para realizar la caracterización de los factores de riesgo presentes en la región, de acuerdo a un esquema general como el siguiente:

- Ganado importado de países afectados por BSE.
- Inclusión de harina de carne y hueso en la alimentación bovina.
- Importación de harina de carne y hueso de países afectados por BSE y/o scrapie.
- Presencia de scrapie en el país.
- Censo ovino y bovino.

- Vigilancia epidemiológica, focalizando particularmente a los animales con mayor riesgo de enfermar, por edad, origen (importados), sistema de alimentación, genotipo de PrP (razas más o menos susceptibles) y presentación de síntomas clínicos (enfermedad neurológica).

Así es como, en relación al primer punto, México importó un total de 143 bovinos entre los años 1981 y 1986, desde países actualmente afectados por la enfermedad, los cuales representan una fracción muy pequeña de la población bovina total y actualmente se considera que esos animales ya no viven, teniendo los más jóvenes 10 años por lo menos, edad que se calcula como mayor a la vida productiva de los bovinos.

No se dispone de una información confiable sobre la distribución de la totalidad de las harinas de carne y hueso en la alimentación de las diferentes especies productivas. Por lo general, se puede decir que la mayor proporción se destina a la suplementación de aves y cerdos y en mucho menor grado a la alimentación de bovinos. Países como Belice, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, poseen plantas procesadoras de harinas de carne y hueso.

La oficina internacional de epizootias (O.I.E) ha establecido una serie de regulaciones, determinando que la situación sanitaria de un país en relación a las EET, sólo puede determinarse a través de vigilancia y seguimientos continuos. Para que la vigilancia sea eficaz, la O.I.E señala que deberán cumplirse los siguientes requisitos mínimos:

- Declaración obligatoria y examen clínico de los casos supuestamente afectados.



- Toma de muestras encefálicas de animales sospechosos realizadas después de su sacrificio o muerte, para ser sometidas a examen de laboratorio conforme a las técnicas descritas en el manual de la O.I.E.
- Registro de los casos confirmados (OIE, 1998).

Así mismo, la OIE establece que en la situación de importaciones de países donde la incidencia de EET es baja, las administraciones sanitarias deberán exigir carnes frescas con la presentación de certificado sanitario internacional en que conste que la enfermedad es de declaración obligatoria en el país exportador, que los animales afectados son sacrificados y destruidos totalmente y que no descenden de hembras afectadas por la enfermedad. También se señala que la harina de carne y huesos que contienen proteínas de rumiantes, no deben ser objeto de comercio entre países, para su utilización en alimentación cuando provienen de un país en que la incidencia de EET es alta o baja (O.I.E, 1998).

De esta manera es recomendable, en base al código zoosanitario de la OIE:

- Establecer en la legislación de los países la prohibición de importación de bovinos, ovinos, embriones y harina de carne y hueso de rumiantes de países afectados por BSE y scrapie.
- Incluir en la legislación la notificación obligatoria de BSE y scrapie.
- Prohibir el uso de harina de carne y hueso de origen rumiante en la formulación de alimentos concentrados para bovinos.
- Fortalecer el sistema de vigilancia epidemiológica de patologías neurológicas en rumiantes y otras especies susceptibles a EET, como félidos (felinos salvajes en

cautiverio y gatos domésticos), cérvidos (en cautiverio), mustélidos (visones criados comercialmente).

- Capacitar personal técnico en el diagnóstico histopatológico, único medio de diagnóstico disponible en el área centroamericana para ambas enfermedades.
- Brindar educación sanitaria a los productores sobre la existencia de la enfermedad para que se realicen las notificaciones de los casos clínicos que presenten signos similares a BSE o scrapie y capacitar a médicos veterinarios oficiales y privados para el reconocimiento clínico de ambas enfermedades y diferenciarlas de otras con signología similar.

No se dispone de evidencia científica que indique el riesgo de transmisión del prion, a través de la leche y derivados, cueros, pieles y semen. Por lo que el comercio de estos productos no conllevaría riesgos, según la OIE, siempre que se cumplan las medidas de control necesaria

### **3.11 SITUACIÓN MUNDIAL**

La aparición de la “enfermedad de las vacas locas” ha producido una reacción a nivel mundial en relación a las enfermedades transmitidas por priones. Así es como desde 1995 se prohibió en Argentina, el uso de alimentos con contenido proteico de origen rumiante. La experiencia de países con bovinos nativos afectados por BSE, indica que esta medida ayuda a reducir el riesgo a adquirir una EET, aunque si se produce una estimulación con una alta carga de infectividad no sería totalmente efectiva (CCCAEEB, 1997).

Por su parte, Brasil prohibió las importaciones de ovinos, caprinos y material genético (semen), de países que registren casos de scrapie. El 12 de Enero del presente año se confirmó el diagnóstico de la enfermedad en ese país, en la ciudad de Candói, en la zona centro-sur del estado de Paraná. De acuerdo con el Ministerio de Agricultura Brasileño, esos animales descendían de una matriz ovina de la raza “Hampshire down” importada desde los Estados Unidos en el año 1989. Luego se descubrió un nuevo foco de scrapie en la misma ciudad, lo que produjo alarma en los sectores agropecuarios, poco después de que fueran sacrificados e incinerados 290 ovinos en Curitiba, la Capital estadual. Ante esta situación, tanto Argentina como Paraguay, anunciaron medidas preventivas que incluyen la prohibición del ingreso de ovinos y subproductos de origen brasileño y de las carnes de origen Europeo (INS., 2001).

En el Reino Unido, en 1988 se prohíbe el uso de proteínas de origen rumiante en la alimentación de bovinos, pero se continúa exportando la mezcla al resto de Europa. Posteriormente se expande esta prohibición al resto de las especies domésticas. En marzo de 1996 el comité asesor de encefalopatías espongiformes (SEAC), anunció la ocurrencia de 10 casos de una nueva variante de la CJD, dada la supuesta exposición a tejido nervioso bovino infectado (cerebro y médula espinal). Sin embargo, hasta la fecha no se ha demostrado concluyentemente la transmisión de las EET al humano, pero la sola posibilidad ha desencadenado una serie de medidas a nivel internacional para evitar la diseminación de la enfermedad.

En el Reino Unido se han controlado hasta la fecha más de 180.000 bovinos afectados, aunque podrían ser más, entre los casi 5.000.000 de animales sacrificados

desde el brote de BSE en 1996. Se estima que casi 1.000.000 de vacas infectadas podrían haber llegado a la cadena de suministro alimentario. Hasta el momento se han ocasionado más de 90 muertes en humanos entre 16 y 42 años (con un promedio de 27,5 años) por la nueva variante de la enfermedad CJD. Actualmente, como la enfermedad tarda más de tres años en incubarse, en Europa se ha tomado la medida de sacrificar a todos los animales mayores de treinta meses y las autoridades comunitarias han recomendado el retiro del mercado europeo de todos los materiales de riesgo, como el cerebro, amígdalas y médula espinal, (Silva, 2001).

Más del 99 % de todos los casos de EEB han sido localizados en el Reino Unido (181.553 casos), donde la epidemia parece haber sido controlada, mientras se extiende por el resto de Europa. Así es como Irlanda presenta 821 casos hasta la fecha, seguida de Portugal con 605, Suiza con un total de 396 casos, Francia con 479 animales diagnosticados positivos y Alemania con 131 casos. Por su parte España ya tiene 78 casos, Bélgica 61, Italia 43, Holanda 25, Dinamarca 8 y ya se han notificado 3 casos en Japón (ANONd).

En países en que se ha presentado el scrapie su control es obligatorio, como en EEUU, pero se sugiere que la prevalencia es mayor que la notificada en forma oficial (Bendheim, 1993). En Enero de 1991, en USA se notificaron más de 100 rebaños afectados con scrapie y 13 sospechosos, lo que implica alrededor de 11.000 animales en riesgo. La enfermedad fue descrita en 43 de los 50 estados, siendo la raza Suffolk la más afectada. El departamento de agricultura de los EEUU ha promulgado varias medidas de control desde 1952, las que no han tenido éxito, por lo que se han realizado programas de certificación voluntaria (Bendheim, 1993).

La incidencia de scrapie a nivel mundial (Tabla N° 3) es difícil de evaluar, puesto que hay muchos países en que no se entrega información, no realizándose reportes oficiales de esta. Inglaterra, donde se describió la enfermedad, hace más de 250 años, aún no ha sido capaz de erradicar la enfermedad, siendo sus últimos reportes 597 casos el año 1999 y 568 el año 2000 (OIE, Handistatus II, 2001).

**SCRAPIE**  
**SITUACION ZOOSANITARIA PRURIANUAL**

<b>PAIS TERRITORIO</b>	<b>1996 – 2000</b>
Alemania	+
Austria	+
Bélgica	+
Brasil	+
Canadá	+
Chipre	+
España	+
Estados Unidos	+
Francia	+
Gambia	+
Grecia	+
Irlanda	+
Islandia	+
Israel	+
Italia	+
Japón	+
Noruega	+
Países Bajos	+
Reino Unido	+
Suiza	+

(OIE, Handistatus II, 2001).

### **3.12 SITUACIÓN NACIONAL**

En Chile el SAG ha diseñado un plan nacional de prevención de scrapie y BSE, cuyos objetivos son impedir el ingreso del agente causal mediante regulaciones y controles sanitarios de las importaciones y ante la eventualidad de su introducción realizar una detección precoz, desarrollando un esquema de emergencia sanitaria que asegure su erradicación. Inicialmente se ha elaborado un estudio para determinar la presencia o ausencia del prion en la región Metropolitana, VI, VII, IX, X, XI y XII regiones (SAG., 1997).

Dada la estrecha relación del scrapie con la EEB, es importante señalar que en Chile se han tomado una serie de medidas preventivas para evitar el ingreso de estas dos enfermedades (SAG, 2001):

- 1980: Se prohíbe la importación de animales vivos (ovinos y caprinos) desde países que no puedan certificar que están libres del prion o con una frecuencia endémica de scrapie y desde 1990 para los bovinos (BSE).
- 1990 : Se prohibió la importación al país de animales, productos y subproductos bovinos de países con riesgo de EEB.
- 1991 : Se realizó una evaluación de riesgo, para demostrar la baja probabilidad de tener la EEB en Chile.
- 1996 : Se estableció la EEB como enfermedad de notificación obligatoria y desde esa fecha la internación al país de semen y embriones bovinos, sólo puede realizarse desde países libres del “mal de las vacas locas”, siendo esto válido también para cualquier producto o subproducto derivado de matadero, que pueda entrar en la cadena alimenticia animal o que sea destinado a la fabricación de productos farmacológicos de uso exclusivo Médico Veterinario.
- 1996-1998 : Se realizó un monitoreo donde se muestrearon 1274 animales de todo Chile para las EET de acuerdo a los procedimientos indicados por la OIE y fueron todos negativos a la enfermedad.
- 2000 : Se prohibió la formulación, elaboración, distribución, venta y uso de alimento y suplementos que contengan proteínas de origen ovino, en la alimentación de rumiantes.

- 2001 : Se norma respecto al procesamiento de las harinas de carne y hueso para inactivar el agente (T°, Tiempo, Presión).

Los objetivos de las estrategias preventivas en Chile dentro del período 2000 - 2006 (SAG, 2001) para estas enfermedades son:

- Conocer la situación a nivel mundial.
- Detectar la eventual presencia del prion y minimizar sus efectos.
- Demostrar y comunicar la condición de libre de scrapie y EEB al mundo.

En relación a las medidas específicas elaboradas por el SAG, 20001 estas se pueden enumerar en:

- Medida 1: Constitución de la comisión Nacional Asesora en materias Zoonositarias del SAG.
- Medida 2: Evaluación de la situación epidemiológica y de las medidas de control en Europa.
- Medida 3: Ampliación a toda Europa de la prohibición de importación de productos con tejidos de riesgo.
- Medida 4: Fortalecimiento de la fiscalización de la normativa que prohíbe el uso de harinas de rumiantes en los rumiantes de todos los puntos de la cadena de comercialización.
- Medida 5: Establecimiento de la obligatoriedad en la fabricación de harinas a 133° por 20 minutos a una presión de 3 bar como indica la OIE.
- Medida 6: Implementación de las nuevas técnicas de diagnóstico para la BSE en el Laboratorio Oficial del SAG.
- Medida 7: Fortalecimiento del programa de vigilancia Activa y Pasiva.
- Medida 8: Capacitación de ganaderos, profesionales y técnicos del agro, del sector público y privado, sobre la EEB.
- Medida 9: Perfeccionamiento del programa de contingencia sanitaria.
- Medida 10: Perfeccionamiento del sistema de trazabilidad sanitaria (identificación predial, identificación animal y control de movimientos).
- Medida 11: Comunicación de la condición de libre de la BSE para dar confianza a los ganaderos, consumidores y actuales y potenciales mercados.

En nuestro país, el nivel de exposición a proteína de origen animal por parte de los bovinos es sustancialmente menor comparado con países endémicos como Inglaterra. Así, el riesgo de presentación de la enfermedad a partir de material alimenticio infectado con scrapie es bajo, dado que las importaciones de alimentos son de muy bajo nivel y de una frecuencia irregular. (SAG, 1997). La situación de ausencia de casos de campo de scrapie y BSE en Chile y países vecinos como Argentina, reduce el nivel de riesgo para el país. Se debe considerar que en Chile los animales van al mercado cuando son muy jóvenes y sólo los reproductores alcanzan el estado adulto, lo cual reduce la posibilidad de encontrar casos positivos. Sin embargo, existe prevalencia de la enfermedad humana, lo que constituye un desafío para un grupo interdisciplinario de investigadores en relación al planteamiento de una eventual transmisibilidad de la enfermedad animal hacia la especie humana, que implicaría una búsqueda metódica constante. Por todos los antecedentes anteriormente descritos nos hemos planteado, en base al método científico, la siguiente hipótesis de trabajo:



## **4. HIPÓTESIS**

De acuerdo a los antecedentes epidemiológicos previamente descritos, se espera no encontrar lesiones histopatológicas asociadas a “scrapie” en los encéfalos ovinos provenientes de la región XI, que serán analizados.

## **5. OBJETIVO GENERAL**

Contribuir a conocer la situación epidemiológica del “scrapie” ovino en nuestro país, determinando la presencia o ausencia de la enfermedad en la XI región de Chile.

## **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

-Describir las características histopatológicas del tronco encefálico, en búsqueda de lesiones asociadas a “scrapie” en encéfalos de ovinos provenientes de mataderos de la región XI de Chile.

-Describir los hallazgos histopatológicos más relevantes encontrados en los encéfalos estudiados.

## **7. MATERIAL Y MÉTODO**

### **7.1 OBTENCIÓN DE ENCÉFALOS PARA EL ESTUDIO**

Se utilizaron 135 encéfalos de ovinos mayores de 5 años destinados a consumo, provenientes de mataderos de la XI región, los cuales fueron puestos en recipientes rotulados y fijados en 4 a 6 litros de formalina salina al 10%. Todos los encéfalos fueron minuciosamente examinados con el fin de dejar para este estudio sólo aquellos encéfalos con integridad macroscópica del tejido. Posteriormente se mantuvieron en formalina durante tres semanas con un cambio semanal de la solución, de acuerdo a los criterios aceptados internacionalmente por la comunidad científica, utilizando como base el protocolo elaborado por el Reino Unido (ECA, 1994).

Los 135 cerebros de ovinos se obtuvieron a partir del estudio poblacional que está realizando el SAG, que incluye el análisis de más de 1000 cerebros estimando una prevalencia crítica de 0.5% y un 99% de confianza.

El análisis histopatológico de las muestras se realizó en el laboratorio central de Patología Animal ubicado en el sector Pecuario del complejo Lo Aguirre, perteneciente al SAG.

## **7.2 OBTENCIÓN DE LOS SITIOS DE CORTE POR LAMINACIÓN**

Al término de la tercera semana de fijación se realizaron 7 laminaciones transversales de aproximadamente 5 milímetros de espesor en todo el encéfalo. El lugar de obtención de los cortes histológicos se realizó de acuerdo a los parámetros internacionalmente aceptados para el diagnóstico histológico de scrapie que corresponden a los siguientes sitios anatómicos:

- I = Obex.
- II = Médula. Caudal a los pedúnculos cerebelosos posteriores.
- III = Puente medio.
- IV = Cerebro medio. A través del colliculus rostral y geniculado medial.
- V = Cerebelo. Corte sagital.
- VI = Diencéfalo. Caudal a la cápsula interna a través del cuerpo mamilar.
- VII = Tálamo. Tracto óptico e hipotálamo.

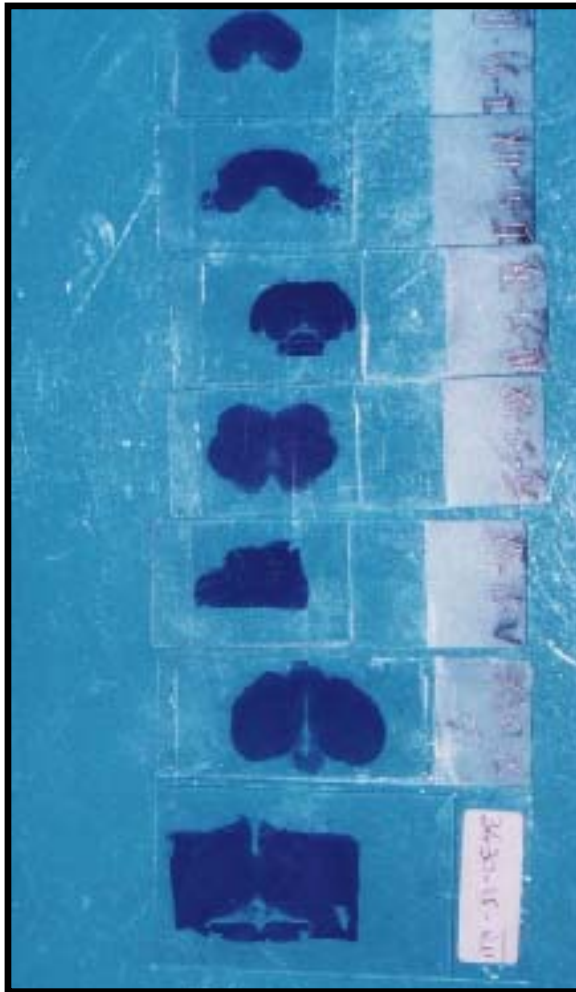
En la Figura N°1 se muestran los siete sitios de corte de encéfalo ovino para el examen histopatológico y en la Figura N° 2 se observan los cortes histológicos realizados para el examen histopatológico de scrapie.

**FIG. N°1:**



Fotografía de encéfalo ovino donde se observan los siete sitios de cortes necesarios para realizar el examen histopatológico de scrapie, según las normativas internacionales.

**FIG. N° 2:**



Fotografía donde se observan los siete cortes histológicos para el examen histopatológico de scrapie, según las normativas internacionales.

### 7.3 PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Este procedimiento se realizó tomando como base el protocolo elaborado por el Reino Unido (ECA, 1994).

Los 7 cortes se procesaron en un equipo autotécnico con vacío (Leica TP 1020), incluyendo deshidratación en batería creciente de alcohol, aclaramiento en cloroformo y baño en parafina, utilizando los siguientes tiempos:

-Alcohol 70% I	3 horas
-Alcohol 70% II	30 minutos
-Alcohol 70% III	45 minutos
-Alcohol 90%	2 x 1 hora con vacío
-Alcohol 100%	3 x 1 hora con vacío
-Cloroformo I	2 horas 30 minutos con vacío
-Cloroformo II	3 horas con vacío
-Parafina I	1 hora 30 minutos con vacío
-Parafina II	3 horas con vacío.

Luego los cortes fueron incluidos en parafina en un dispensador (Leica EG 1160), para ser cortados en un micrótopo (Leitz 1512) 5 micrones de espesor y luego teñidos con Hematoxilina-Eosina adaptada para scrapie, utilizando los siguientes tiempos:

■ Xilol	2 x 2 minutos.
■ Alcohol absoluto	2 x 1 minuto.
■ Alcohol 70 %	30 segundos.
■ Lavado con agua	2 minutos.
■ Hematoxilina de Harris acidificada	8 minutos.
■ Lavado con agua	2 minutos.
■ Alcohol ácido (0.1 % ácido clorhídrico)	10 segundos.
■ Lavado con agua	5 minutos.
■ Carbonato de Litio (1.5 %)	30 segundos.
■ Lavado con agua	10 minutos.
■ Eosina (2 % agua más 0.2 % formalina)	4 minutos.
■ Lavado con agua	5 minutos.
■ Alcohol absoluto	2 x 2 minutos.
■ Xilol	3 x 1 minuto.
■ Montaje (con medio adherente).	1 minuto.



## 7.4 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para realizar el diagnóstico histopatológico de scrapie se consideraron los criterios usados por el Reino Unido y aceptados internacionalmente por la comunidad científica (ECA, 1994). De acuerdo a esto, las muestras analizadas fueron calificadas de la siguiente forma:

**Diagnóstico positivo:** Cuando existen vacuolas en la sustancia gris (cambio espongiforme) y menos vacuolas en el pericarion neuronal, teniendo siempre una distribución simétrica y bilateral. La aparición de astrocitosis y de otros tipos de degeneración neuronal sirven para el diagnóstico, siempre que estén asociadas a cambios vacuolares.

**Diagnóstico inconcluso:** Presencia de lesiones vacuolares asimétricas.

**Diagnóstico negativo:** Ausencia de lesiones de tipo vacuolar en los cortes establecidos.

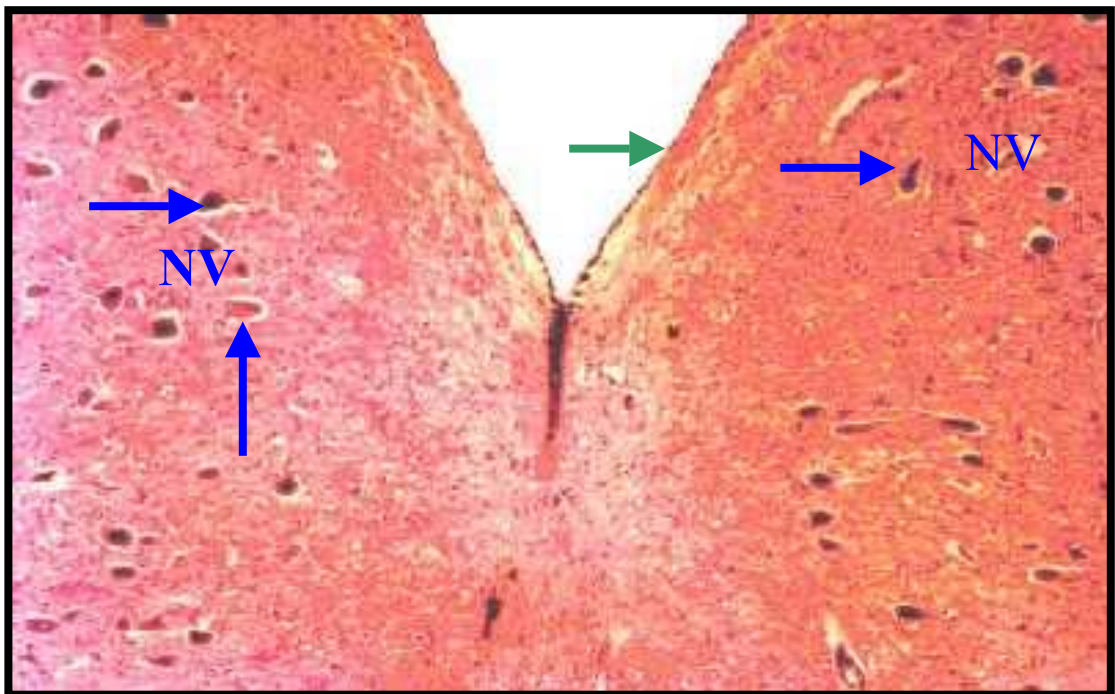
**Se tomaron fotografías de las lesiones encontradas, con una cámara Nikon FX - 35DX, incorporada a un microscopio óptico Nikon Labophot - 2A, utilizando una película Fujicolor Superia 24 x 36 mm ISO 100.**

## 8. RESULTADOS

Los resultados de este estudio se presentan a continuación a través de microfotografías de cortes histológicos, realizados en las distintas zonas de encéfalos ovinos descritas anteriormente. Las alteraciones encontradas se agruparon en: lesiones vacuolares tanto en el pericarion neuronal como en el neuropilo, alteraciones que involucran cambios inflamatorios, alteraciones pigmentarias, parasitarias y lesiones traumático-hemorrágicas.

En la Figura N° 3 se muestra una vista normal de un corte histológico de encéfalo ovino, encontrada en nuestro estudio.

**FIG. N°3:**



Microfotografía de un corte histológico de encéfalo ovino normal a nivel del Obex. Las flechas azules (→) indican cuerpos neuronales que se encuentran a ambos lados del piso del cuarto ventrículo correspondientes al núcleo dorsal del vago (NV).

La flecha verde (→) señala células del Epéndimo. Tinción H & E. 40 X.

En relación a las alteraciones de vacuolización encontradas en el pericarion neuronal, éstas se ubicaron en 6 de los encéfalos estudiados y se distribuyeron en forma no específica en relación a los núcleos nerviosos. Las vacuolizaciones detectadas se caracterizaron por ser unilaterales y presentarse en forma única, es decir univacuolar y no multivacuolar, comprometiendo sólo a una neurona en 5 de los encéfalos y a 2 neuronas en uno de estos cerebros. En la figura N° 4 se presenta un corte histológico a nivel del pedúnculo cerebeloso caudal, en el que es posible apreciar una vacuola.

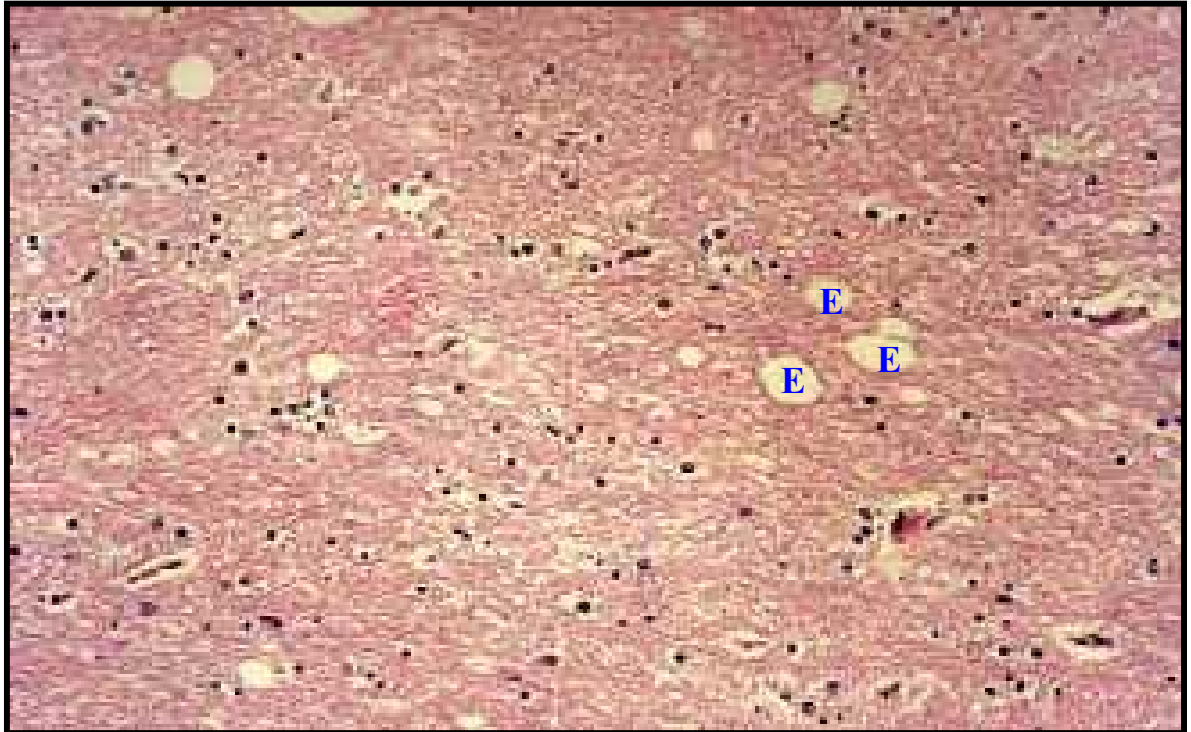
**FIG. N°4 :**



Microfotografía de un corte histológico a nivel del Pedúnculo Cerebeloso Caudal en la que se aprecia una vacuola (V) en el pericarion neuronal. Tinción H & E. 200 X.

En 5 de los encéfalos estudiados se observaron lesiones vacuolares en el neuropilo de la sustancia gris, hallazgos caracterizados por la presencia de espacios irregulares correspondientes a una espongirosis (Figura N° 5).

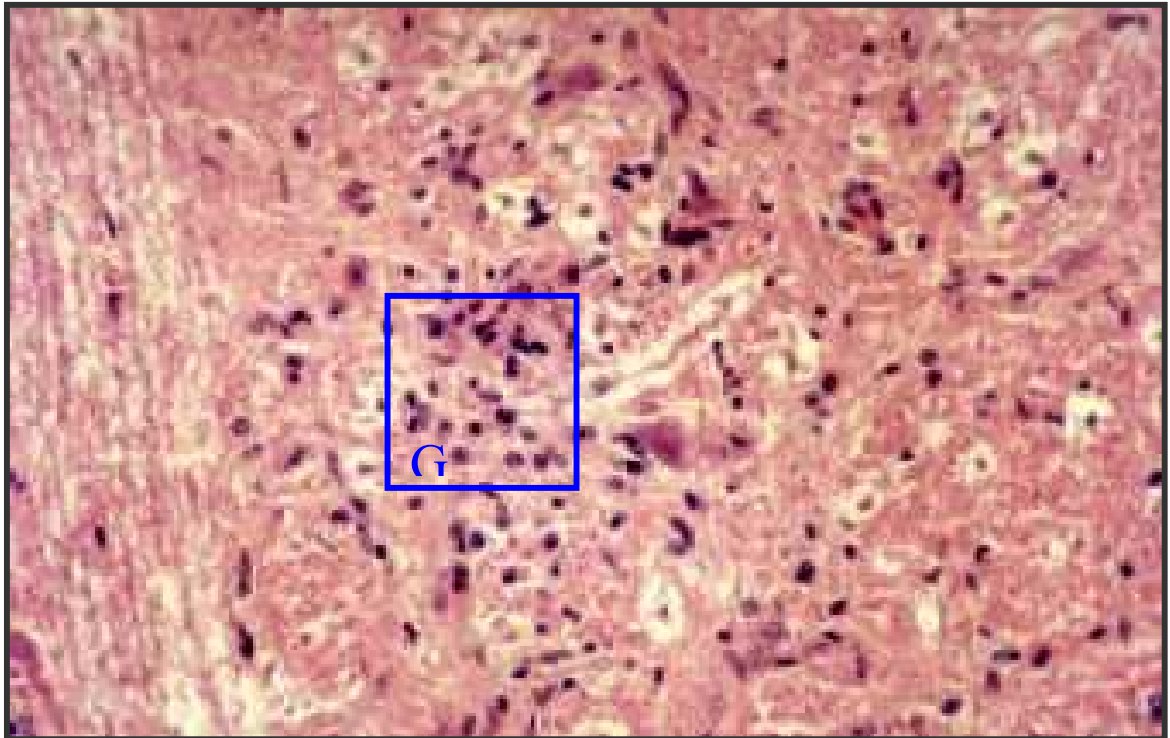
**FIG. N° 5 :**



Microfotografía de un corte histológico de Encéfalo ovino. (E) indica la presencia de espacios irregulares en el neuropilo de la materia gris. Tinción H & E. 100 X.

En la siguiente figura se muestra una lesión encontrada con muy baja frecuencia, correspondiente a una “gliosis”, es decir, un aumento en la cantidad de células de la glía, específicamente oligodendroglías. (Figura N° 6).

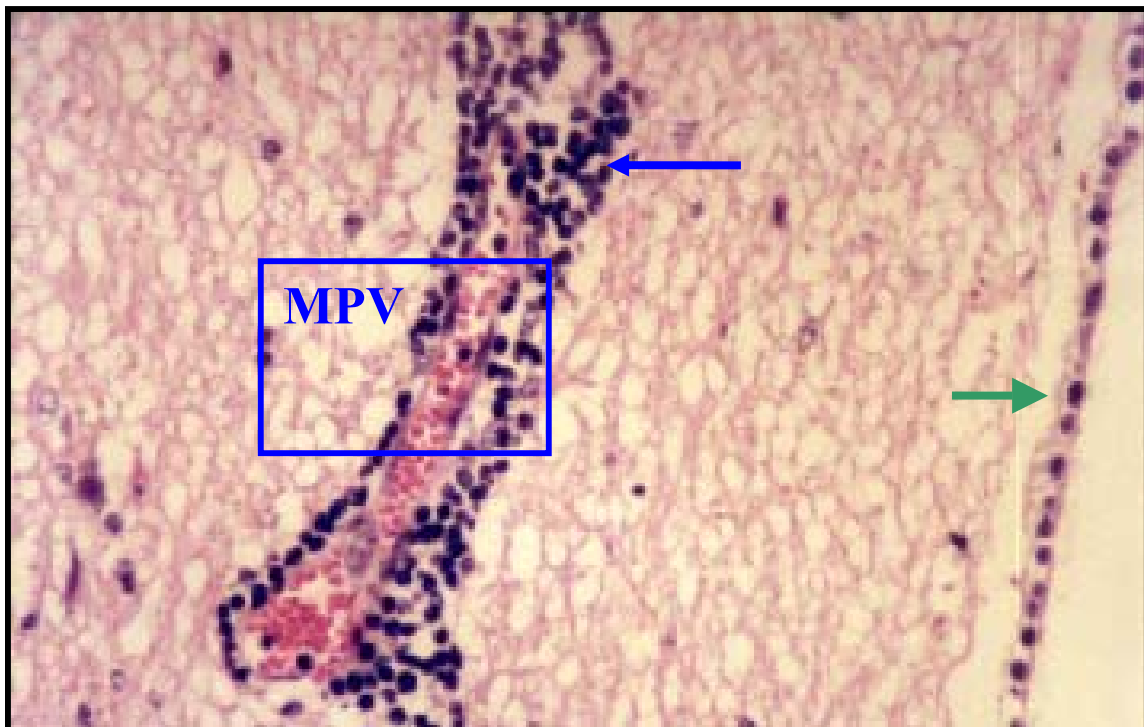
**FIG. N°6 :**



Microfotografía de un corte histológico a nivel del Pedúnculo Cerebeloso Caudal. En el recuadro se observa una gliosis (G). Tinción H & E. 200 X.

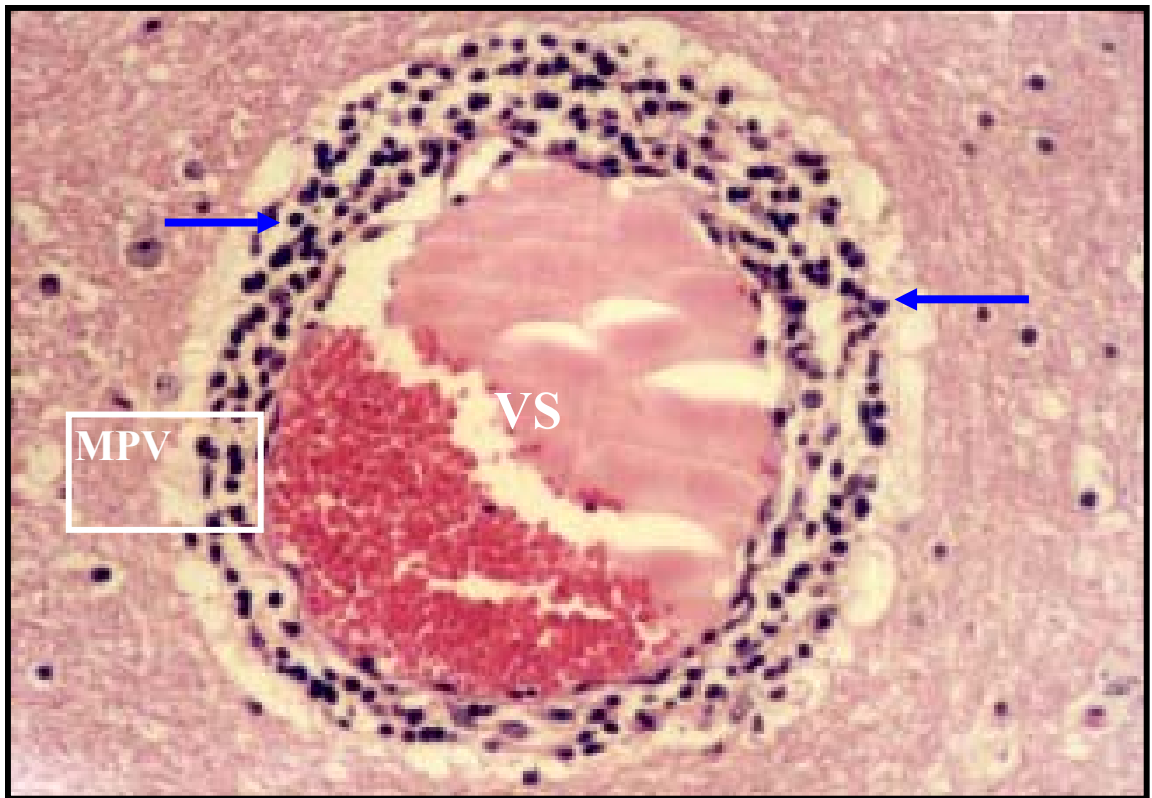
En las siguientes dos figuras es posible observar la presencia de alteraciones inflamatorias, específicamente manguitos perivasculares, las que fueron encontradas en 46 de los encéfalos estudiados. Estas lesiones se caracterizaron por estar compuestas preferentemente por células mononucleares correspondientes a linfocitos. La intensidad de esta reacción fue de carácter leve en la mayoría de los casos (43 encéfalos de 46) y de una intensidad mayor en algunos casos (3 encéfalos de 46). La figura N° 7 presenta la estructura de un manguito perivascular en un corte longitudinal, mientras que en la figura N° 8 se observa un corte transversal de un manguito.

**FIG. N°7 :**



Microfotografía de un corte histológico de encéfalo ovino. El recuadro muestra el corte longitudinal de un Manguito Perivascular (MPV). La flecha azul (→) indica el predominio de células linfocitarias. La flecha verde (→) señala células del conducto del epéndimo. Tinción H&E. 200 X.

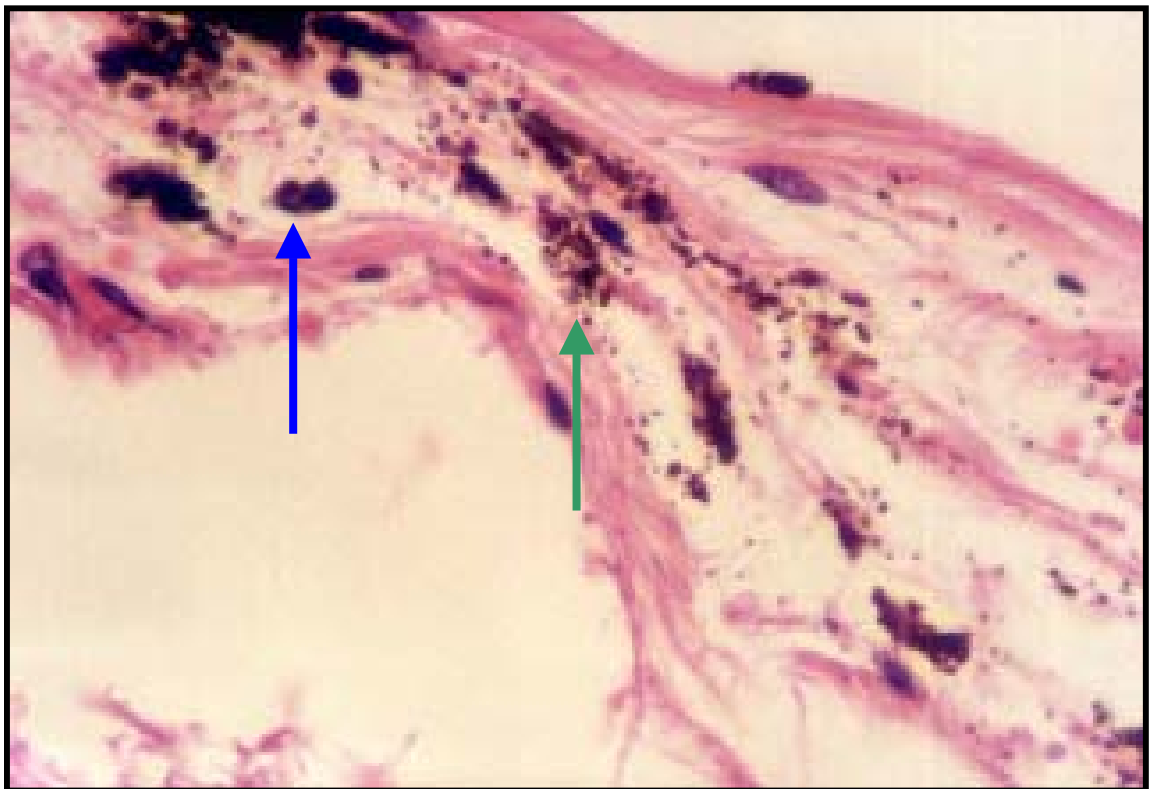
**FIG. 8 :**



Microfotografía de un corte histológico de encéfalo ovino. El recuadro señala el corte transversal de un Manguito Perivascular (MPV). Se indica la presencia de un vaso sanguíneo (VS). La flecha azul (→) hace notar el predominio de células linfocitarias. Tinción H & E. 200 X.

Por otra parte se observaron alteraciones pigmentarias a nivel de las meninges en 12 de los encéfalos analizados. Se encontró melanocitos y presencia de melanina, lo que corresponde a un proceso conocido como melanosis (Figura N°9).

FIG. N° 9 :



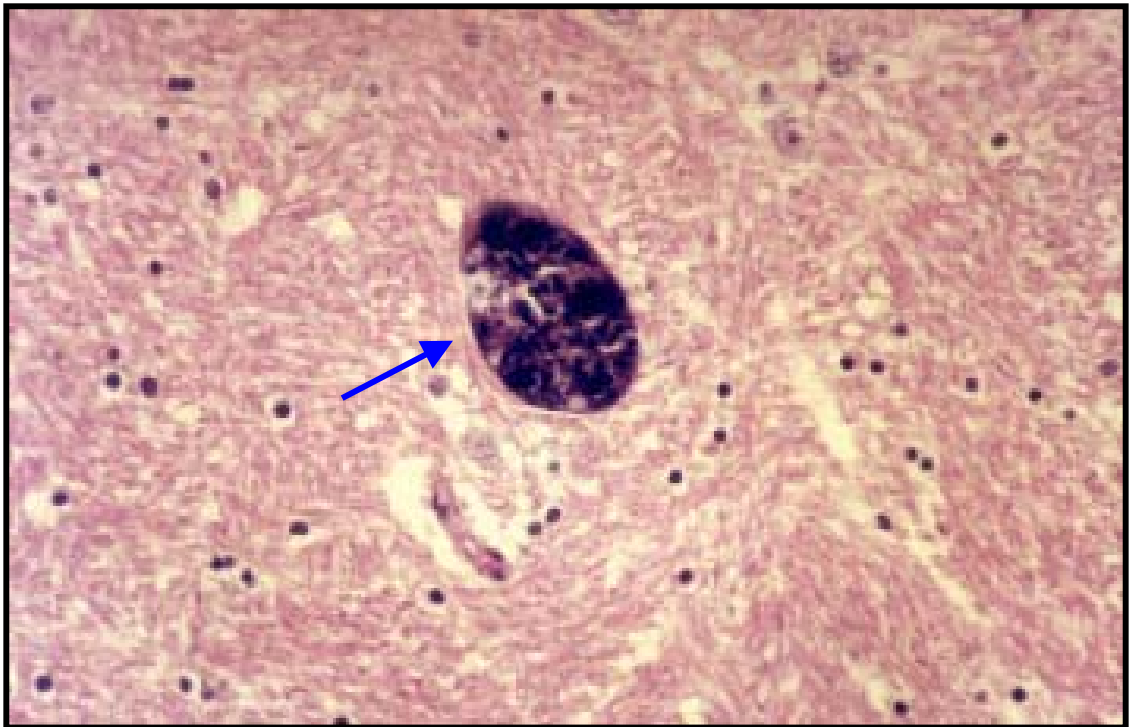
Microfotografía de un corte histológico de cerebelo. La flecha azul (→) muestra la presencia de melanina en las meninges. La flecha verde (→) indica melanocitos. Tinción H & E. 400 X.





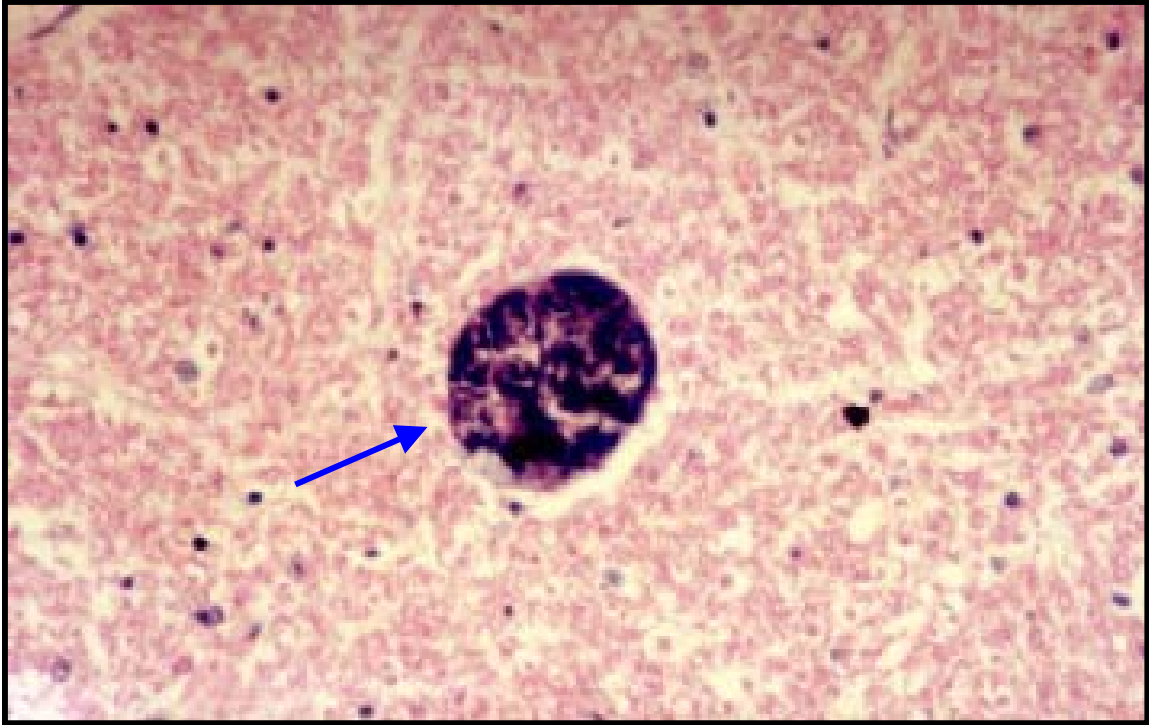
En 15 del total de los encéfalos analizados, se encontraron alteraciones de tipo parasitarias en diferentes regiones de este tejido, como por ejemplo a nivel del Tálamo (Figura N° 10) y del Obex (Figura N° 11). Estas correspondieron a formaciones redondeadas y ovaladas de forma regular, con una membrana delgada en cuyo interior se pudo apreciar la presencia de estructuras de morfología tortuosa, las que se relacionan estrictamente con la presencia de “Zoitos”. Estas formaciones corresponden a quistes parasitarios de *sarcocystes* sp. Por otra parte en ninguno de los cortes se detectó reacción del tipo inflamatoria alrededor de estas formaciones.

**FIG. N° 10 :**



**Microfotografía de un corte histológico a nivel del Tálamo. La flecha azul ( ) indica la presencia de un Quiste parasitario de Sarcocyste sp. sin respuesta inflamatoria del tejido. Tinción H & E. 200 X.**

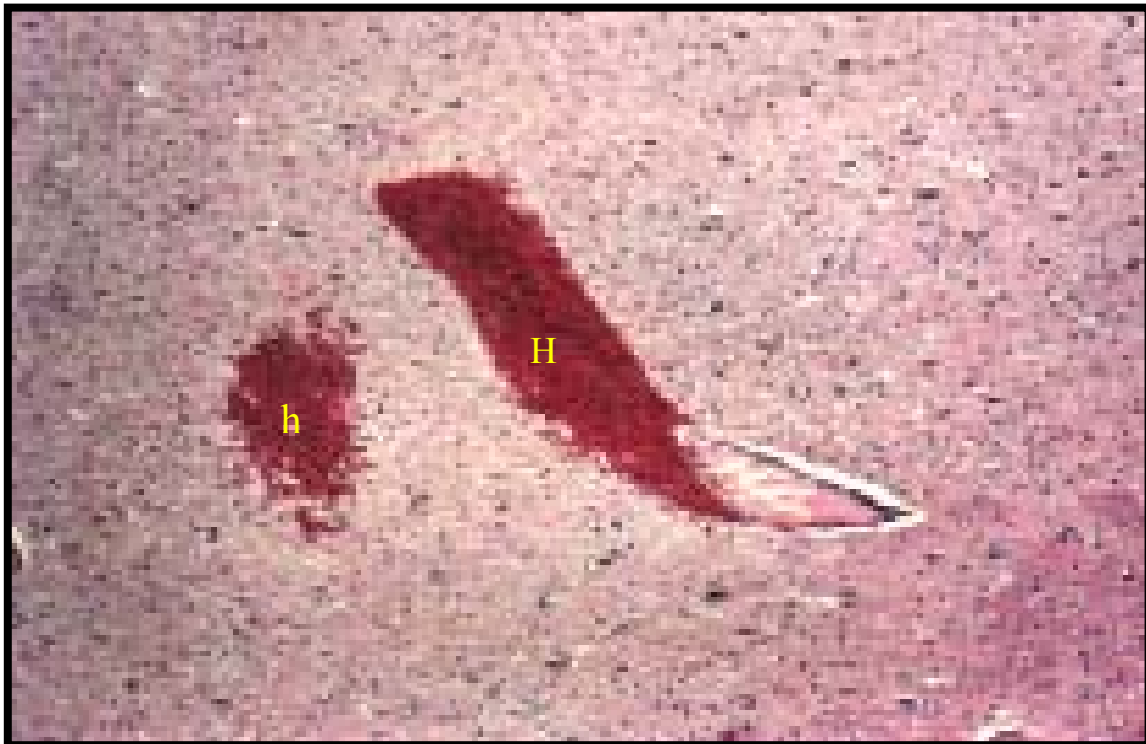
**FIG. N° 11 :**



**Microfotografía de un corte histológico a nivel del Obex. La flecha azul (→) indica la presencia de un quiste parasitario de *Sarcocystis* sp. Nótese la ausencia de reacción inflamatoria. Tinción H &E. 200 X.**

Por otro lado, en un total de 35 de los encéfalos analizados se observaron lesiones traumático-hemorrágicas, que fueron de una intensidad leve a moderada. Estas lesiones se ubicaron principalmente alrededor de los vasos sanguíneos y en el parénquima del tejido nervioso. En algunos casos fue posible observar hemorragia (Figura N° 12), caracterizada por ruptura de vasos, produciéndose la salida de eritrocitos hacia el neuropilo. En otros cortes fue posible observar congestión (Figura N° 13), caracterizada por acúmulo de eritrocitos en el interior de los vasos sanguíneos.

**FIG. N° 12 :**



**Microfotografía de un corte histológico a nivel de médula, caudal a los Pedúnculos Cerebelosos Posteriores. Se muestra la presencia de hemorragia en forma difusa cerca de un vaso sanguíneo (H) o en forma focal a nivel del parénquima neuronal (h). Tinción de H & E. 40 X.**

En la siguiente figura se observa un vaso sanguíneo con congestión encontrado en el cuerpo mamilar a nivel del diencéfalo.

FIG. N° 13 :



Microfotografía del Cuerpo Mamilar (Diencéfalo). Se observa un vaso sanguíneo ( VS ) con congestión. La flecha azul ( → ) señala células endoteliales. Tinción H & E. 200 x.

En la Tabla N°4 se muestra la distribución de las alteraciones histopatológicas encontradas en los cortes histológicos realizados en el presente estudio.

**Tabla N °4:**

**DISTRIBUCION DE LAS ALTERACIONES HISTOPATOLOGICAS:**

<b>Vacuolas pericarion</b>	<b>Vacuolas neuropilo</b>	<b>Lesiones inflamatorias (manguitos)</b>	<b>Lesiones pigmentarias (melanina)</b>	<b>Parásitos (Quistes Sarcocystes)</b>	<b>Lesion traumático - hemorrágica</b>
#6	#5	#46	#12	#15	#35
n=135	n=135	n=135	n=135	n=135	n=135

# : Número de encéfalos afectados.

n : Total de muestras analizadas.

De acuerdo con los resultados encontrados y en base a los datos analizados, a continuación se discuten los puntos más importantes en el marco de los objetivos propuestos para este trabajo, relacionándolos con otras investigaciones realizadas en este tema.

## 9. DISCUSIÓN

De acuerdo con el análisis de las muestras de encéfalos de ovinos provenientes de la XI Región de Chile y apoyados en algunos autores, es posible establecer que las lesiones de tipo vacuolar de los encéfalos que fueron encontradas en nuestro estudio, tanto en el pericarion como en el neuropilo, se pueden considerar como hallazgos incidentales, que en cierto grado, corresponden a factores que sólo dificultan el diagnóstico histológico, debido a que en primer lugar se encuentran en forma aislada sin un patrón específico de ubicación en los cortes y por otra parte, su presentación no es característica de ninguna enfermedad específica, ya que incluso se encuentran presentes de manera ocasional en cerebros de ovejas sanas.

Además, el número de las vacuolas observadas en el presente estudio, resulta ser muy pequeño si se compara con el número de éstas lesiones usualmente encontradas en los casos positivos de scrapie (OIE, 1996). Se debe considerar que la presencia de vacuolización del pericarion corresponde a un hallazgo específico de scrapie en cerebros de ovinos, donde cumplen un papel trascendental el grado y distribución de las lesiones (Detwiler, 1992; Wells y Mc Gill, 1992).

Nuestro estudio, como ya se mencionó, se ajustó a los criterios de diagnóstico histopatológico reconocidos internacionalmente (ECA., 1994). En base a esto podemos decir que las lesiones vacuolares encontradas (Figura N° 3 y N° 4) no tuvieron un patrón de presentación específico de scrapie. A modo comparativo en una investigación realizada por Beck y col. (1961), citado por Bendheim (1993), en que se examinaron 34 ovejas afectadas de scrapie, en 21 de éstos animales el cerebelo y el eje hipotalámico hipofisiario se vieron afectados de igual forma. En los ejemplares citados, se observó una importante degeneración a nivel cerebelar y en 7 de los casos el compromiso hipotalámico hipofisiario fue mayor. Esto último, reafirma el patrón específico de ubicación de las lesiones en los animales declarados positivos a la enfermedad de scrapie, lo cual no se encontró en nuestro estudio.

Al respecto, Wilber y col. (1995), encontraron neuronas con grandes vacuolas en el pericarion y algunos pocos espacios en la sustancia gris del neuropilo. Además,



la topografía y distribución de los cambios más importantes encontrados en la sustancia gris fue típica del scrapie, principalmente en la parte rostral del cerebro, diencéfalo y corteza cerebelar. También existió una cierta asociación entre la astrocitosis encontrada y la vacuolización neuronal en cuanto a la ubicación de éstas, lo cual confirma el diagnóstico positivo a la enfermedad. Es así como a modo de ejemplo, el núcleo rojo presentó severa vacuolización neuronal, como es común de encontrar en ovejas afectadas por la enfermedad. Además observaron vacuolización cerebelar acompañada de una proliferación de la glía en la corteza del cerebelo, principalmente a nivel de la línea media formando pequeños montones de núcleos a lo largo de las células de Purkinge (Wilber y col, 1995).

Se debe considerar que las lesiones vacuolares, tanto en el pericarion como en el neuropilo neuronal, pueden encontrarse en forma generalizada en cortes histológicos de encéfalos no bien preservados o fijados, lo cual es ocasionado principalmente por cambios post mortem del tejido nervioso (Davis y col., 1991). Por otra parte, la vacuolización neuronal del pericarion que compromete a muy pocas neuronas, es posible de encontrarla en ovejas aparentemente sanas (OIE, 2000). De esta forma las lesiones vacuolares encontradas en nuestro estudio, tanto en el pericarion como en el neuropilo de los encéfalos de ovinos, al no tener un patrón específico de ubicación y no presentarse de manera simétrica y bilateral en los cortes histológicos, no se podrían asociar específicamente a scrapie, si no más bien, a hallazgos histopatológicos normalmente presente en cerebros de ovejas sanas.

En relación a la presencia de gliosis en nuestra investigación (Figura N° 5), no se encontró un aumento importante en el número de células gliales, así como tampoco agrupaciones evidentes de éstas con algún patrón geográfico determinado. Se debe tener presente que la gliosis se puede encontrar en diversas patologías neuronales, sin embargo, en el caso del scrapie ésta es más marcada en las áreas donde existe el mayor daño neuronal y se debe a un aumento en el número y tamaño de los astrocitos. De esta manera, en un estudio realizado por Wilber y col., (1995) en que se infectó de forma experimental el agente de scrapie, se encontró gliosis originada por una hipertrofia e hiperplasia de los

astrocitos en la sustancia gris, siendo mucho más numerosos que lo normal y ubicándose en forma de focos astrocitarios con un aumento del tamaño del núcleo.

En nuestro estudio los hallazgos de alteraciones inflamatorias incluyendo la presencia de manguitos perivasculares (Figura N° 6 y N° 7), se caracterizaron por un predominio de células inflamatorias del tipo linfocitarias de baja intensidad, por lo que se presume que estas alteraciones constituirían un hallazgo histopatológico normal. Así, la presencia de lesiones inflamatorias, dentro de las que se encuentran los manguitos perivasculares, corresponderían más bien a una inflamación del tejido nervioso del tipo encefalitis, que puede tener diversos orígenes siendo el de origen viral el que se caracteriza por presentar un predominio de linfocitos, en cuyo caso las encefalitis se definen como no supurativas (Jubb y col., 1995).

Por otra parte, las células mononucleares dispersas en el área perivascular, son posibles de encontrar en el área postrema de animales normales (Jubb y col., 1995) y no se consideran parte del cuadro de scrapie ovino. En todo caso los hallazgos de encefalitis de tipo linfocitaria encontrados en nuestro estudio, en 3 de los 135 encéfalos analizados, se pueden asociar a un cuadro de etiología viral y no de scrapie.

Las observaciones realizadas en las muestras analizadas en relación con las alteraciones pigmentarias encontradas (Figura N° 8), específicamente de melanina en las meninges, se pueden explicar debido a que este es un pigmento endógeno que normalmente está presente en la piel, retina y túnica media del ojo e iris, así como también es frecuente de encontrar en la aorta y en las meninges del ganado bovino y ovino. Sin embargo, este acúmulo de melanina en áreas focales de las meninges, cerebro y médula espinal no produce reacción inflamatoria local ni síntomas clínicos (Runnells y col., 1978).

Con respecto a las estructuras parasitarias encontradas en este estudio (Figuras N° 9 y N° 10), éstas correspondieron a quistes de *Sarcocystes* sp. La presencia de este parásito en el tejido nervioso ha sido asociada a encefalitis en distintas especies animales, incluidos los ovinos (Dubey y col., 1989). De esta forma en los ovinos la presencia de estos quistes parasitarios en el cerebro, no se asocia a ninguna reacción de tipo inflamatoria, siempre y cuando los esquizontes permanezcan intactos, ya que de no ser así, se podría observar una reacción perivascular (Parihar, 1987).

Por otra parte, las lesiones traumático-hemorrágicas encontradas en las muestras de los cortes histológicos de encéfalos de ovinos estudiados (Figura N° 11 y N° 12) , se asocian a traumas que afectan al sistema nervioso central (Storts, 1988), lo cual se puede relacionar con la forma de insensibilización utilizada a nivel de mataderos en la XI región de nuestro país.

En base al análisis y la discusión de los resultados obtenidos, se pueden establecer como las principales, las siguientes conclusiones :

## 10. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los criterios utilizados por el Reino Unido y aceptados internacionalmente los hallazgos obtenidos en el presente estudio histopatológico de cortes de encéfalos de ovinos provenientes de mataderos de la XI región de Chile, no se asociarían a la encefalopatía espongiiforme ovina conocida como scrapie.
- Las lesiones vacuolares encontradas tanto en el pericarion como en el neuropilo de los encéfalos estudiados, no se asocian a scrapie ovino, sino más bien, a hallazgos histopatológicos normalmente presentes en cerebros de ovejas sanas.
- La presencia de gliosis se considera un hallazgo inespecífico y no asociado a scrapie.
- En relación a la presencia de lesiones inflamatorias, específicamente manguitos perivasculares, estos corresponderían a hallazgos histopatológicos debido a su baja presentación e intensidad, excepto en 3 casos, que se asociarían a una encefalitis de etiología viral.
- Con respecto a las alteraciones pigmentarias (presencia de melanina) se consideran hallazgos ocasionales que pueden estar presentes en animales adultos.
- Con relación a las estructuras parasitarias encontradas (quistes de *Sarcocystes* sp.), no se pueden asociar a ningún grado de encefalitis porque no existe la reacción de tipo inflamatoria.
- Las lesiones traumático-hemorrágicas observadas en los cortes estudiados, se deberían fundamentalmente a los métodos de insensibilización utilizados en los mataderos de la XI región de nuestro país.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **ANONa.** 2001. Un nuevo test de orina podría detectar la presencia de la EEB. [en línea]. Agrodigital.com. 25 septiembre 2001. <<http://agrodigital.com>> [consulta:03-10-2001].
- **ANONb.** 2001. El manejo de plagas y enfermedades transfronterizas y sus efectos económicos. [en línea]. El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2001. <<http://www.fao.org/DOCREP/003/X9800s/X9800s17.htm>>. [consulta:03-10-2001].
- **ANONc.** 2001. CJD en Reino Unido. [en línea]. <[www.doh.gov.uk/CJD/stats/nov01.htm](http://www.doh.gov.uk/CJD/stats/nov01.htm)>. [consulta:25-11-2001].
- **ANOND.** 2001. BSE in Europe. [en línea]. <<http://ourworld-top.cs.com/j1braakman/BSE1.htm>>. [consulta 08-12-2001].
- **BENDHEIM, P.** 1993. Natural scrapie in sheep - A review. *Isr. J. Vet. Med.* 48 : 96-106.
- **BOLTON, D.; MCKINLEY, M.; PRUSINER, S.** 1982. Identification of protein that purifies with the scrapie prion. *Science.* 218 : 1309-1311.
- **COHEM, F.E. ; PRUSINER. S.B.** 1998. Pathologic conformations of Prion Proteins. *Annu. Rev.Biochem.* 67:793-819.
- **(CCCAEEB) COMISIÓN CIENTÍFCA CONSULTORA ARGENTINA SOBRE EEB.** 1997. Argentina, país libre de BSE. Conclusiones y recomendaciones. Informe final. [en línea]. Buenos Aires Argentina. Trabajos científicos argentinos. <<http://www.microsoft.com/isapi/redir.dll?prd=ie&cid=0x080apver=ar=IStart>>. [consulta:15-02-2001].

- **COOPER, M.; THOMAS, R.** 1978. Enfermedades parasitarias. **In.** Producción del cordero. 3ªEd. Biblioteca Agrícola AEDOS. Barcelona, España. pp.133- 147.
  
- **CUBILLOS, V.; GIMENO, E.** (1991). Encefalopatías Espongiformes. Chile-Argentina. Universidad Austral de Chile-Universidad Nacional de la Plata. pp.1-17.
  
- **CUTLIP, R.; MILLER,J.; RACE, R.; JENNY, A.; LEHMKUHL, H.; ROBINSON, M.** 1996. Experimental Transmission of Scrapie to Cattle. Clarence Gibbs. Springer-Verlag New York, Inc. Bovine Spongiform Encephalopathy. 7:92-96.
  
- **DAVIS, A.J.; JENNY, A.L.; MILLER, L.D.** 1991. Diagnostic characteristics of bovine spongiform encephalopathy. J.Vet. Diagn. Invest. 3:266 - 271.
  
- **DAWSON, M.; HOINVILLE, L.; HOSIE, B.; HUNTER, N.** 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Vet. Rec. 142(23):623-625.
  
- **DE ARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.** 1995. Etiology and pathogenesis of prion disease. Am. J. Pathol. 146(4):785 - 811.
  
- **DETWILER, L.A.** 1992. Scrapie. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 11(2):491-530.
  
- **DUBEY, J.P. ; SPEER, C.A.; MUNDAY, B.L.; LIPSCOMB, T.P.** (1989). Ovine sporozoan encephalomyelitis linked to sarcocystis infection. Vet. Parasitol. 34 : 159 - 163.
  
- **(ECA) EUROPEAN COMMISSION AGRICULTURE.** 1994. Transmissible Spongiform Encephalopathies: Protocols for the laboratory diagnosis and confirmation of

bovine spongiform encephalopathy and scrapie. A Report from the Scientific Veterinary Committee. pp.1-2 .

- **GARCÍA, J.A.** 1998. Curso de formación sobre encefalopatías espongiformes animales y otras enfermedades nerviosas. Dirección general de producción, industrialización y comercialización agraria. Madrid, España. pp.1-31.
- **HUNTER, N.; FOSTER, J.; HOPE, J.** 1992. Natural scrapie in British sheep: Breeds, ages and PrP gen polymorphism. Vet. Rec. 130:389-392.
- **(INS) INTERNATIONAL NEWS SERVICE.** 2001. Prohibida importación de ovino y caprino de países con "scrapie". [en línea]. Agencia Brasil-Radiobrás. <<http://www.microsoft.com/isapi/redir.dll?prd=ie&clid=0x080apver=ar=IStart>>. [consulta :15-02-2001).
- **JEFFREY, M.; GOODSIR, C.; BRUCE, M.; McBRIDE, P.; FRASTER, J.** 1997. In vivo toxicity of prion protein in murine scrapie : Ultrastructural and immunogold studies. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 23:93-101.
- **JUBB, K.; KENNEDY, P.; PALMER, N.** 1995. Sistema Nervioso. **In.** Patología de los animales domésticos. 1ª Ed. Agropecuaria Hemisferio Sur. Montevideo Uruguay. pp.366-370.
- **KIMBERLIN, R.H.** 1992. Encefalopatía Bovina Espongiforme. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 11(2):441-489.
- **LINNABARY, R.; HALL, R.** 1991. Scrapie in sheep. The compendium food animal. 13(3):511-516.
- **MARTIN, W.B.** 1988. Enfermedades de la oveja. 1ª Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp.77-82.

- **(OIE) ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS.** 1998. Taller internacional sobre vigilancia de las encefalopatías espongiformes transmisibles (CJD-BSE):Encefalopatía espongiforme transmisible. Manual de entrenamiento. OMS.; OPS.; INPPAZ.;OIE. Buenos Aires, Argentina. pp.1-36.
  
- **(OIE, ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. HANDISTATUS II).** 2001. Mundo. Prurigo lumbar. Situación zoonosológica plurianual. (frecuencias). [en línea]. <<http://www.oie.int>>. [consulta:08-12-2001].
  
- **PAN, K-M.; BALDWIN, M.; NGUYEN, J.; GASSET, M.; SERBAN, A.; GROTH, D.; MEHLHORN, I.; HUANG, Z.; FLETTERICK, R.; COHEN, F.; PRUSSINER, S.** 1993. Conversion of  $\alpha$ -hélices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. USA. Proc. Natl. Acad. Sci. 90:10.962-10.966.
  
- **PIZARRO, J.** 1998. Priones : ¿un patógeno emergente?. Tecno Vet. Chile. (3): 8 - 10.
  
- **PRUSINER, S.B.** 1995. The Prion Diseases : Prions, once dismissed as an impossibility, have now gained wide recognition as extraordinary agents that cause a number of infectious, genetic and spontaneous disorders. Sci. Am. 30:37.
  
- **(RMB) ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS.** 2001. The Prionics Check LIA. [en línea]. BSE ASSAY. <[http://indbio.roche.com/indbio/ind/BSE/prionics\\_check.htm](http://indbio.roche.com/indbio/ind/BSE/prionics_check.htm)>. [consulta:03-10-2001].
  
- **RUNNELLS, R.A. ; MONLUX, W.S. ; MONLUX, A.W.** (1978). Principio de patología veterinaria. 1ª Ed. Editado por R.A. Runnells ; W.S. monlux ; A.W. monlux. México, D.F., México. Compañía Editorial Continental S.A. 703 pp.



- **(SAG) SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 1997. Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y otras encefalopatías. Boletín técnico. 2ª Ed. Subdepartamento de divulgación técnica. SAG. Chile. 48 pp.
  
- **(SAG) SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2001. Medidas preventivas y específicas de BSE en Chile. [diapositivas]. Santiago, Chile. 20 pp.
  
- **SCHREUDER, B.E.; VAN KEULEN, L.J.; VROMANS, M.E.; LANGUEVELD, J.P.; SMITS, M.A.** 1998. Tonsillar biopsy and PrPsc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. Vet. Rec. 142:564-568.
  
- **SILVA, B.** (2001). Comisión Europea Ocultó por años información sobre “Vacas Locas”. El Mercurio. Santiago, Chile, 28 Enero. A-8.
  
- **STAHL, N.; BALDWIN, M.; TELOW, D.; HOOD, L.; GIBSON, B.; BURLINGAME, A.; PRUSINER, S.** 1993. Structural studies of the Scrapie Prion Protein Using Mass Spectrometry and Amino Acid Sequencing. Biochemistry. 32:1991-2002.
  
- **TAYLOR, D.; FERNIE, K.; McCONNELL I.; FERGUSON, C.; STEELE, S.** 1998. Solvent extraction as an adjunct to rendering the effect on BSE and scrapie agents of hot solvents followed by dry heat and steam. Vet. Rec. 143:6-9.
  
- **TORRES, J.M.** 1998. Biología de los priones. Centro de investigación en sanidad animal (INIA). Ed.Valdeolmo. Madrid, España. pp.1-9.
  
- **WELLS, G.; McGILL, I.** 1992. Recently described scrapie-like encephalopathies of animals:case definitions. Res. Vet. Sci. 53:1-10.

- **WELLS, G.A.; HAWKINS, S.A.; GREEN, R.B.; AUSTIN, A.R.; DEXTER, I.; SPENCER, Y.I.; CHAPLIN, M.J.; STACK, M.J.; DAWSON, M.** 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiforms encephalopathy (BSE): An update. *Vet. Rec.* 142:103-106.
  
- **WILESMITH, J.W.** 1994. Bovine Spongiform Encephalopathy and related disease:An epidemiology overview. *New Zealand. Vet. J.* 42:1-8.
  
- **WOOD, J.; DONE, S.** 1992. Natural scrapie in goats:Neuropathology. *Vet. Rec.* 131:93-96.
  
- **YE, X.; CARP, R.; KASCASAK, R.** 1994. Histopathological changes in the islets of langerhans in scrapie 139 h - affected hamsters. *J.Comp. pathol.* 110:153-167.