



SUBGERENCIA DE PROTECCIÓN Y REGULACIÓN PECUARIA
GRUPO DE DIAGNÓSTICO VETERINARIO

ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA (EEB)

*TOMA Y ENVÍO DE MUESTRAS PARA EL
DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO*

HÉCTOR EDUARDO GONZÁLEZ CHARRY, DMV. MSc. PhD.
CLAUDIO ALFONSO BOHÓRQUEZ CAICEDO, DMV. MSc.

Bogotá D.C., Colombia, 2002

© Instituto Colombiano Agropecuario, ICA
Subgerencia de Protección y Regulación Pecuaría
Grupo de Diagnóstico Veterinario

Tipo de publicación: Boletín técnico

Código: 00.02.01.02

Edición: Grupo Transferencia de Tecnología, ICA

Tiraje: 1.000 ejemplares

PRODUCCIÓN EDITORIAL

Diagramación, armada, fotomecánica,
impresión y encuadernación



www.produmedios.com

Tel.: 288 5338 Bogotá, DC - Colombia

El contenido de esta publicación es propiedad intelectual del ICA

Impreso en Colombia

Printed in Colombia

ÍNDICE

| | Pág. |
|--|------|
| INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1. LA ENFERMEDAD | 7 |
| 2. MATERIALES ESPECÍFICOS DE RIESGO PARA LA SALUD HUMANA..... | 7 |
| 3. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD..... | 8 |
| a. Datos clínicos..... | 8 |
| b. Estudios histopatológicos..... | 8 |
| c. Pruebas de inmunohistoquímica | 8 |
| d. Pruebas de Elisa y Western Blot | 8 |
| 4. MÉTODOS PARA LA RECOLECCIÓN DE TEJIDOS | 8 |
| 4.1. Protocolo A. Remoción completa del cerebro (bovinos)..... | 8 |
| <i>Equipo requerido</i> | 9 |
| <i>Procedimiento</i> | 9 |
| 4.2. Protocolo B. Técnica del agujero magno | 10 |
| <i>Equipo requerido</i> | 10 |
| <i>Procedimiento</i> | 10 |
| 5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 11 |
| 6. OTRAS MUESTRAS | 12 |
| APÉNDICE | 13 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 14 |

INTRODUCCIÓN

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), fue causa de recientes acontecimientos mundiales relacionados con su presencia como una enfermedad emergente en el ganado, la cual se sospecha que puede ser transmitida al hombre al entrar a su cadena alimenticia, animales contaminados por esta enfermedad. Por tal motivo, los países libres hasta ahora de dicha patología han prohibido el ingreso de animales y sus productos a sus territorios, cuando provienen de países afectados, especialmente de Europa, donde se detectó por primera vez en 1986 en el sureste de Inglaterra.

Por lo anterior, el Instituto Colombiano Agropecuario ICA, como ente responsable de la sanidad en el país, y acorde con las nuevas políticas estratégicas mundiales para combatir la EEB, por recomendaciones de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), ha tomado medidas tendientes a prevenir su aparición en el territorio nacional mediante la vigilancia epidemiológica activa de la enfermedad, y a mantener en estado de alerta a las autoridades competentes, los productores, los profesionales del agro, a la salud pública, a los fabricantes de alimentos concentrados de origen animal y a la población en general.

El presente boletín busca contribuir a esa vigilancia activa y a servir como guía para los médicos veterinarios y para el personal encargado de llevar a cabo las necropsias de rumiantes que hayan muerto con sintomatología neurológica. Busca también capacitar a este personal en la toma pertinente de muestras para enviar al laboratorio de histotecnica del Laboratorio Nacional de Diagnóstico del ICA en Bogotá, centro de referencia nacional para el diagnóstico de la enfermedad.

1. LA ENFERMEDAD

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) es el nombre científico de la enfermedad conocida popularmente como “Enfermedad de las Vacas Locas”, patología que fue diagnosticada por primera vez en el Reino Unido en 1986. Es una afección degenerativa del sistema nervioso central, incurable, de los bovinos, que se caracteriza por la aparición de síntomas neurológicos progresivos en animales adultos, que concluyen con la muerte. La enfermedad es causada por un agente transmisible no convencional, que corresponde a una proteína infecciosa llamada “prión”. Esta patología se caracteriza por tener un período de incubación prolongado, que fluctúa entre los 2.5 y 8 años en promedio.

Los síntomas clínicos son consecuencia de la acumulación del prión en las neuronas, originando la muerte de éstas y aunque pueden variar de caso a caso se pueden resumir así:

- Pérdida progresiva de peso y disminución de la producción sin causas aparentes.
- Cambios del comportamiento.
- Hiperestesia progresiva.
- Incoordinación locomotriz.
- Hipersensibilidad a los estímulos lumínicos, sonoros y táctiles.
- Tremor, particularmente de los músculos de la cabeza y el cuello.
- Finalmente convulsiones, parálisis y muerte.

Estos síntomas tienen una duración que va desde las 4 semanas hasta los 6 meses. Un análisis microscópico revela lesiones tales como vacuolas, que dan al tejido nervioso un aspecto de esponja. La vía de transmisión hasta ahora comprobada es la ingestión por los bovinos de alimentos de origen animal contaminados con la proteína infectante.

2. MATERIALES ESPECÍFICOS DE RIESGO PARA LA SALUD HUMANA

Son considerados materiales de alto riesgo los siguientes órganos de rumiantes muertos con sintomatología neurológica y sospechosos de padecer EEB o Scrapie:

a) Bovinos

- El **cráneo**, incluido el **encéfalo**.
- Los **ojos**.
- Las **tonsilas**.

- La **médula espinal** de animales de más de doce meses de edad.
- El **intestino**, del duodeno al recto.

b) Ovinos y caprinos

- El **cráneo**, incluido el **encéfalo** y los **ojos**.
- Las **tonsilas** y la **médula espinal** de animales de más de **doce** meses de edad.
- El **bazo** de animales de todas las edades.

3. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

Se basa en cuatro fuentes así:

a) Datos clínicos: Aportan “sospechas” de la presencia de la enfermedad.

1. Sólo afecta a individuos adultos.
2. El período de incubación es largo, en promedio de 2.5 a 8 años.
3. La duración del período clínico también es muy larga.
4. Sintomatología de tipo neurológico.
5. Desenlace siempre fatal.
6. Suele haber ausencia de alteraciones macroscópicas evidentes.

b) Estudios histopatológicos: “Descubren” la presencia de la enfermedad.

1. El análisis de las muestras de tallo encefálico por microscopía óptica permite apreciar las alteraciones espongiiformes clásicas que le dan el nombre a esta enfermedad:

- Vacuolización de los cuerpos y las prolongaciones neuronales.
- Puede aparecer necrosis neuronal y astrogliosis.

Estas lesiones deben detectarse en los núcleos neuronales del óbex, pedúnculos cerebelares caudales y colículo superior, principalmente (tallo encefálico).

2. La microscopía electrónica revela la presencia de un material denominado “fibrillas asociadas al Scrapie” (FAS).

c) Pruebas de inmunohistoquímica: Sirven para confirmar los estudios histopatológicos, inclusive los sospechosos o no concluyentes. Confirman la presencia del agente en tejido nervioso.

d) Pruebas de ELISA y WESTERN BLOT: Detectan la presencia de priones en tejido nervioso.

Este documento se referirá únicamente a la toma y envío de muestras para el diagnóstico histopatológico.

4. MÉTODOS PARA LA RECOLECCIÓN DE TEJIDOS

En la actualidad existen dos técnicas para obtener las muestras pertinentes:

- A. La remoción completa del cerebro.
- B. La obtención del tallo cerebral por la vía del agujero magno.

4.1. Protocolo A. Remoción completa del cerebro (bovinos)

Es la más usada en nuestro medio para descartar otras neuropatías como la rabia.

Equipo requerido:

- Una prensa grande, montada en un soporte metálico o de madera o empotrada en la pared (no es esencial, pero sí recomendable). En el campo se debe idear un método para fijar el cráneo durante la manipulación.
- Un cuchillo grande, bien afilado.
- Un bisturí.
- Una sierra o segueta de 40 cm de longitud o un hacha o hachuela.
- Unas tijeras.

Procedimiento:

1. Desarticular la cabeza en la articulación atlanto-occipital accediendo a dicha articulación ventralmente, asegurándose que la espina dorsal sea incidida lo más caudal posible. En este momento examinar la superficie, las cápsulas articulares y el aspecto del líquido cefalo-raquídeo que fluye cuando la duramadre es seccionada.
2. Asegurar la cabeza en una prensa o manualmente (en el campo), tomando las precauciones de seguridad (Figura 1).
3. Retirar la piel y músculos de las áreas frontal y occipital de la cabeza (Figura 1).
4. Aserrar transversalmente los huesos frontales, un poco caudal a las órbitas. Después hacer cortes en cada lado del cráneo, comenzando en los puntos medios de las órbitas, extendiéndose caudalmente



Figura 1. Cabeza fijada en una prensa; piel y músculos frontales y occipitales retirados.



Figura 2. Las líneas punteadas indican los sitios del cráneo en donde se deben hacer los cortes para extraer el cerebro.

hacia el área dorsal de cada uno de los conductos auditivos externos. Continuar estos cortes caudalmente hasta el agujero magno (Figura 2). Después retirar lo que se ha cortado y el cerebro quedará expuesto en su totalidad, con la duramadre intacta (Figura 3).



Figura 3. Al retirar los huesos del cráneo queda expuesto el cerebro con la duramadre intacta.

5. Remover la duramadre con la ayuda de tijeras y pinzas de disección. Después se debe invertir la cabeza para que por medio de la gravedad se obtenga la separación del cerebro de la base del cráneo. Los nervios craneales pueden ser cortados con un bisturí tan pronto sean expuestos, obteniéndose así la

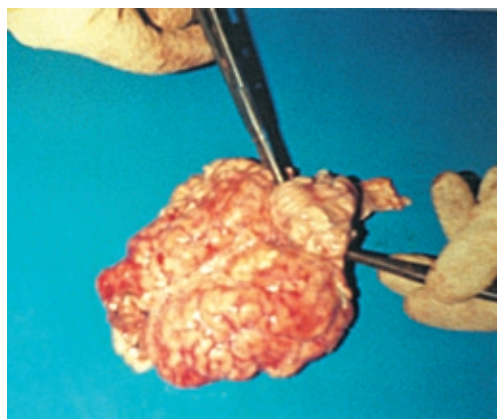


Figura 4. Cerebro completo. La duramadre se retira con pinzas y bisturí.

remoción del cerebro intacto (Figura 4). Evitar al máximo manipular y presionar el tejido nervioso durante la remoción para evitar artefactos que alteren el estudio histolo-patológico.

6. Examinar el cerebro para detectar posibles lesiones macroscópicas.

4.2. Protocolo B. Técnica del agujero magno

Esta técnica se utiliza especialmente cuando es necesario obtener muestras de gran cantidad de animales sospechosos de padecer EEB.

El tallo encefálico puede ser removido con seguridad y rápidamente por la vía del agujero magno. Con el uso de esta técnica se obtienen muestras de tejidos más pequeñas, acelera el proceso de fijación y reduce el volumen de la solución de fijación requerida.

Equipo requerido:

- Unas tijeras rectas.
- Un cuchillo plano bien afilado.
- Una espátula con forma de L o una cuchara grande.
- Pinzas de disección.
- Una linterna de minero-sujeta a la cabeza del técnico (es opcional) o una linterna de mano convencional (es recomendable).

Procedimiento:

1. Desarticular la cabeza del cadáver en la articulación atlanto-occipital y colocarla

con la parte dorsal hacia abajo en la mesa de necropsias o en el piso.

2. Por medio de una disección cuidadosa, separar la médula de la duramadre y seccionar los nervios espinales. Una linterna de minero o la convencional manual puede ser de gran ayuda para visualizar el cerebro dentro de la cavidad craneana.



Figura 5. Obtención del tallo encefálico por la vía del agujero magno.

3. Elevar la médula para exponer los pedúnculos cerebelares y seccionarlos usando un cuchillo convencional bien afilado.

4. Insertar la espátula con el borde filoso dirigido dorsalmente a través del aspecto dorsal del agujero magno dentro del espacio sub-dorsal al nivel del puente. Después rotar o girar completamente la espátula para seccionar el tallo encefálico (Figura 5).

5. Halar cuidadosamente la médula espinal, sujetando la arteria basilar y luego insertar la espátula en forma de L a nivel del pons (puente) y con un movimiento circular seccionar el tallo encefálico. Luego seccionar el óbex, el cual debe ser enviado en formol buferado



Figura 6. Tallo encefálico obtenido por la vía del agujero magno, con el óbex seccionado al lado derecho.

para histopatología y el resto del tallo encefálico se envía refrigerado para virología (Figura 6).

5. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

A continuación se describen los cortes que se le deben hacer a las muestras remitidas al laboratorio de histotecnia y que son específicas para hallar lesiones producidas por la Encefalopatía Espongiforme de los Bovinos (EEB).

Se debe hacer un examen macroscópico del encéfalo fijado. Rutinariamente se deben hacer cortes histopatológicos con intervalos de 5 mm en los dos hemisferios y examinar las superficies de dichos

cortes. Los cortes pertinentes para el diagnóstico de la EEB, son obtenidos exclusivamente del tallo encefálico, se recomienda hacer cortes en cuatro sitios específicos del tallo encefálico, después de haber retirado el cerebelo:

1. Colículo Rostral **CR** (Mesencéfalo).
2. Colículo Caudal **CC** (Mesencéfalo).
3. Pedúnculo Cerebelar Caudal **C**.
4. Óbex **O**, es el corte más importante. En este corte se detectan las lesiones más características (Figuras 7 y 8). Estas muestras deben ser fijadas en formol buferado al 10%.

6. OTRAS MUESTRAS

Las enfermedades neurológicas de los bovinos son múltiples y multifactoriales, de tal manera que se debe maximizar el esfuerzo de la recuperación de una muestra para darle el mejor uso posible. Para este fin se debe considerar que una muestra puede ser sometida a estudios virológicos, bacteriológicos y si existen las posibilidades de infraestructura pueden realizarse estudios toxicológicos y así tener la oportunidad de reconocer la causa de otras neuropatologías frecuentes en Colombia.

Los cortes adicionales a realizar son:

1. Corte sagital medial por el vermes cerebelar (Figura 9 a).
2. Corte (corteza) parietal a nivel de los cuerpos mamilares (Figura 9 b).



Figura 7. Tallo encefálico sin cerebelo. T: Tálamo. CR: Colículo Rostral. CC: Colículo Caudal. M, C y R: Pedúnculos Cerebelares Medio, Caudal y Rostral. IV: Cuarto Ventrículo. O: Óbex. MC: Médula Cervical.



Figura 8. Sitio de corte del óbex.

3. Porción de hipocampo (Figura 9 c).

Estas muestras junto con la porción de tallo encefálico sobrante después de obtener el óbex, para histopatología se deben enviar refrigeradas.

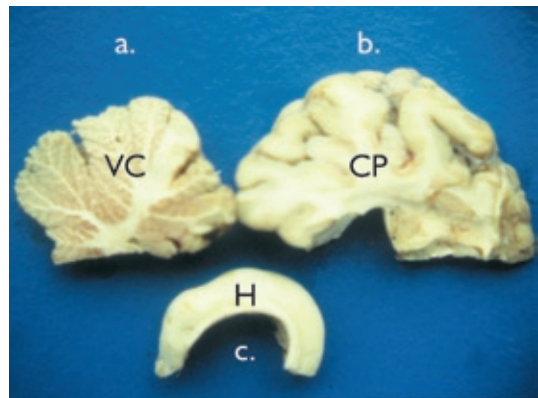


Figura 9. a. Corte sagital del vermes cerebelar. b. Corte parietal de la corteza. c. Porción de hipocampo.

APÉNDICE

Fórmula del formol buferado al 10% (preparación de 20 litros).

- | | |
|--|-----------|
| 1. Formaldehído al 37-40% | 2.000 ml. |
| 2. Fosfato monobásico de sodio | 80.4 g. |
| 3. Fosfato dibásico de sodio | 327.4 g. |
| 4. Agua de chorro hasta completar 20 litros. | |

BIBLIOGRAFÍA

- COMISIÓN EUROPEA DE AGRICULTURA PARA LAS ENCEFALOPATÍAS TRANSMISIBLES ESPONGIFORMES. Septiembre de 1994. *Confirmación de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) y el "Scrapie" por medio de la examinación microscópica del cerebro*. Protocolos para los Laboratorios de Diagnóstico y Confirmación de la EEB y el "Scrapie". Un reporte del Comité Veterinario Científico.
- DE BARROS, Claudio S.L.; AMARAL DE LEMOS, Ricardo Antonio y MAUAD CAVALLERO, João Crisóstomo. 2000. *Manual de procedimientos para el diagnóstico histológico diferencial de la Encefalopatía Espongiforme de los Bovinos (EEB)*.
- WWW.EEB.ES. 2001. *EEB, Encefalopatía Espongiforme Bovina*. Datos extraídos del Ministerio de Sanidad y Consumo Español.

Terminó de imprimirse en el mes de
septiembre de 2002 en los talleres de



www.produmEDIOS.com

Tel.: 288 5338

Bogotá, DC - Colombia