

**Universidad Nacional.**

**Facultad de Ciencias de la Salud.**

**Escuela de Medicina Veterinaria.**

**Enfermedades del sistema nervioso central en bovinos: estudio retrospectivo de los casos atendidos por el servicio de diagnóstico patológico (UNA) en el año 2003 con énfasis en la Encefalopatía Espongiforme Bovina.**

**Modalidad: Tesis.**

Trabajo final de graduación para optar por el Grado Académico de Licenciatura en Medicina Veterinaria.

**Aida J. Chaves Hernández.**

**Tutor: Dr. Juan Alberto Morales.**

**Campus Presbítero Benjamín Núñez.**

**2005.**

## COMITÉ ASESOR

Dr. Juan Alberto Morales

Tutor

---

Dr. Carlos Jiménez

Lector

---

Dr. Alexis Sandí

Lector

---

Fecha

---

## **DEDICATORIA**

A quien afianza mis pasos y bendice mi camino.

A quien ocupa gran parte de mi corazón: mi mamá.

Al trabajador inagotable: mi papá.

## AGRADECIMIENTOS

Muchas son las personas que de una u otra manera colaboraron en la finalización de esta tesis y de mi carrera. Pero, ante todo son mis amigos (as) los que me han dado el aliciente para continuar y no desfallecer por dura que parezca la prueba.

En especial le agradezco a Laura Alvarado sus consejos y oraciones, por ayudarme a recuperar la esperanza y la fe.

Saber enseñar es un arte que requiere conocimiento y la habilidad para transmitirlo, eso lo aprendí del Dr. Juan Alberto Morales. Gracias por conceder con generosidad sus ideas.

Igual gratitud merece el Dr. Carlos Jiménez, que posee este mismo don y mucha paciencia.

También agradezco al Dr. Alexis Sandí y a la Dra. Gaby Dolz, por cada consejo y corrección que aportaron a este trabajo.

Del mismo modo, retribuyo a la Dra. Karol Hidalgo su valiosa colaboración con el entrenamiento en la técnica de IHQ, por abrirme las puertas de su laboratorio en el HSJD.

A mis hermanos, mis amigos elegidos por Dios desde antes de existir.

A mis amigas, Mariela Quesada, Hellen Porras, Mariana Marengo, Laura Brenes y Johanna Alfaro. Su amistad me permite definir con propiedad esta palabra: fidelidad.

La medicina requiere amor para comprenderla, esa es mi percepción después de hablar con el Dr. Alexis Berrocal. Gracias Doctor por enseñarme que éste es el comienzo de un largo recorrido por la ciencia.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS.

DEDICATORIA .....	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	ix
RESUMEN .....	x
ABSTRACT .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	1
<b>1.1. Antecedentes</b> .....	1
1.1.1. Generalidades sobre los priones y patogénesis. ....	3
1.1.5. Signos clínicos en la EEB y diagnósticos diferenciales.....	3
1.1.6. Pruebas de diagnóstico .....	4
1.1.6.1. Hallazgos histopatológicos.....	4
1.1.6.1. Otras técnicas de diagnóstico.....	5
<b>1.2. Justificación</b> .....	6
<b>1.3. Objetivos</b> .....	7

1.3.1. Objetivo general.....	7
1.3.2. Objetivos específicos.....	7
<b>2. METODOLOGÍA.....</b>	<b>8</b>
2.1. Población: tamaño, origen y recolección de la muestra .....	8
2.2. Procesamiento, análisis e interpretación de la muestra .....	9
2.2.2. Análisis histopatológico .....	9
2.2.3. Técnica de IHQ para detección de la PrPres .....	11
2.3. Técnicas adicionales .....	14
2.3.1. Técnica de IHQ en una meningo-encefalitis piogranulomatosa .....	14
2.3.2. Técnica de inmunohistoquímica en un tumor cerebral .....	15
2.3.3. Técnica de inmunofluorescencia (IFA) para rabia .....	15
2.3.4. Técnica de inmunohistoquímica para rabia.....	15
3. RESULTADOS .....	16
4. DISCUSIÓN.....	20
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>6. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>
<b>8. ANEXOS.....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1:</b> Sintomatología presentada en 56 animales con síntomas en los que se detalla la historia .....	34
<b>Cuadro 2:</b> Sintomatología reportada en 15 animales con historia clínica completa y confirmados como positivos para la rabia en la prueba de inmunofluorescencia .....	35
<b>Cuadro 3:</b> Número y porcentaje de casos que presentan lesiones histopatológicas en las 108 muestras procesadas .....	35
<b>Cuadro 4:</b> Número de casos que presentan encefalitis, meningitis y vacuolización intraneuronal según localización anatómica de la lesión y el grado de severidad en las 108 muestras procesadas .....	36
<b>Cuadro 5:</b> Diagnósticos histopatológicos en los 108 casos analizados .....	37
<b>Cuadro 6:</b> Hallazgos histopatológicos en 26 casos de rabia confirmados con la inmunofluorescencia.....	37
<b>Cuadro 7:</b> Número de casos que presentan encefalitis, meningitis, vacuolización intraneuronal e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas (Cuerpos de Negri) según localización anatómica de la lesión y el grado de severidad en 26 casos positivos de rabia .....	38

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura <b>1</b> : Hallazgos histológicos y de IHQ en el control positivo .....	39
Figura <b>2</b> : Meningo-encefalitis piogranulomatosa.....	40
Figura <b>3</b> : Amebas de vida libre.....	41
Figura <b>4</b> : Sarcoma de la meninges.....	42
Figura <b>5</b> : Lesiones halladas en casos de rabia .....	43
Figura <b>6</b> : Corpúsculos de Negri y resultados de IHQ para rabia.....	44

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ECJv:	Enfermedad de <i>Creutzfeldt Jacob</i> nueva variante.
ECJ:	Enfermedad de <i>Creutzfeldt Jacob</i> .
EEB:	Encefalopatía espongiforme bovina.
EETs:	Encefalopatías espongiformes transmisibles.
H&E:	Hematoxilina y eosina.
IF:	Inmunofluorescencia.
IHQ:	Inmunohistoquímica.
OIE:	Organización Mundial de Sanidad Animal.
P.A.P:	Peroxidasa antiperoxidasa.
PrPc:	Proteína priónica normal.
PrPres:	Proteína priónica anormal.
RU:	Reino Unido.
SNC:	Sistema nervioso central.
UE:	Unión Europea.

## RESUMEN

En este estudio, fueron examinados 108 cerebros de bovinos muestreados como parte del programa de vigilancia de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB). Comprendió 73 animales con sintomatología nerviosa y 35 vacunos de matadero. En estos cerebros, se realizó el estudio histopatológico de diferentes secciones del tejido nervioso con el fin de hallar lesiones que fueran compatibles con la EEB. Como resultado de este análisis no se encontraron indicaciones de que la enfermedad existiera en el país. En 34 de estas muestras, se realizó la prueba de inmunohistoquímica (IHQ) con el kit Pullman TSE-IHC/99 (VMRD, Inc, WA, USA), el sistema Shandon y el anticuerpo monoclonal F99/97.6.1, con el objetivo de descartar la presencia de PrPres o príon patógeno. De estas pruebas, ninguna presentó una reacción positiva como la obtenida en las secciones de médula oblongada, puente y cerebelo de una oveja inoculada con el agente de *scrapie*, utilizada como control positivo. Se discute acerca de la técnica de IHQ como método complementario que permite el diagnóstico de las enfermedades producidas por priones.

Este trabajo además, incluye un análisis retrospectivo de las enfermedades del sistema nervioso central (SNC) que afectaron los bovinos de Costa Rica durante el año 2003 y que se determinaron mediante la histopatología y el uso de técnicas adicionales. De esta manera, se pudo diagnosticar un caso de meningoencefalitis por amebas, otro de meningoencefalitis piogranulomatosa por *Listeria monocytogenes* y uno de sarcoma de las meninges, así como 26 casos de rabia establecidos mediante inmunofluorescencia.

## ABSTRACT.

A total of 108 bovine brains, taken from the Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) Surveillance Program, were evaluated. The samples were obtained from 73 animals with observable neurological signs, and from 35 slaughter house animals. Histopathological studies of different sections of nervous tissues were done in order to find correlating lesions with BSE. The analysis of the results indicated that the disease was not present in the country. In 34 of the samples, an immunohistochemical test (IHQ) was performed, using the kit Pullman TSE-IHC/99 (VMRD, Inc, WA, USA), the Shandon system, and the monoclonal antibody F99/97.6.1, with the objective to determine the existence of the pathogen prion. From these tests, not one sample produced a positive reaction. The positive control used was obtained from sections of the pons, medulla oblongata, and cerebellum taken from a sheep inoculated with *scrapie* disease. This technique has been accepted as a complementary diagnostic method for BSE.

This study also includes a retrospective analysis of central nervous system diseases that affected bovines in Costa Rica during 2003. Histopathology and additional tests were conducted to diagnose the presence of diseases. From these tests, a case of amoebic meningoencephalitis, a case of pyogranulomatous meningoencephalitis caused by *Listeria monocytogenes*, a case of meningeal sarcoma, and 26 cases positive to rabies using an immunofluorescent technique.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES

Las patologías del sistema nervioso central (SNC) en los bovinos, como la rabia, listeriosis, poliencéfalomalacia y tumores intracraneales, entre otras, pueden llegar a manifestarse en enfermedades cuyos signos clínicos resulten ser similares o idénticos. Por esta circunstancia es que se requiere un examen clínico exhaustivo para obtener un diagnóstico preciso que, en algunos casos, demandará una confirmación *postmortem* (Radostitis et al., 2000). La observación del tipo de lesiones que pueden causar estos patógenos en el SNC, sirven como base para realizar un diagnóstico morfológico, ya que al establecer el tipo de respuesta del tejido (duración, distribución y tipo de lesión) y al reconocer el grado de significancia de la lesión, es posible llegar a determinar la causa primaria o el diagnóstico etiológico (Cheville, 1999).

El principal factor que hace trascendental conocer la etiología de las enfermedades, es que muchas de ellas tienen impacto en la salud pública y consecuencias socioeconómicas sustanciales. Es el caso de la rabia que continúa siendo una de las zoonosis más importantes en el mundo (Martínez, 1999), o como la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) que ha acarreado serias pérdidas económicas como resultado de restricciones al comercio internacional a los países que presentan casos (OIE, 2003).

La EEB es una enfermedad crónica, degenerativa y fatal del SNC (Gibbs et al., 1992). Es causada por un agente denominado prión, definido por S. B. Prusiner en 1982, como una proteína infecciosa desprovista de ácido nucleico (Prusiner, 1998). Los priones producen unas

patologías conocidas como encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), tanto en los animales como en los humanos (Hillerton, 1997).

La EEB fue diagnosticada por primera vez, en noviembre de 1986 en Gran Bretaña (Bradley, 1990) y se cree que su diseminación, a nivel de epidemia se pudo deber a cambios en las prácticas de procesamiento en los mataderos a principios de los años 80, en la elaboración de concentrados y suplementos alimenticios para rumiantes a bajas temperaturas (Wilesmith et al., 1988). Como consecuencia de este reciclaje y dispersión del agente, las autoridades sanitarias británicas prohibieron la práctica de alimentar a los rumiantes con harinas de carne y hueso y otras fuentes de proteína animal (OIE, 2004b). Pero, a pesar de estas medidas el mal se difundió a otras naciones, por lo que la Unión Europea (UE) la consideró una enfermedad de declaración obligatoria. Posteriormente, en marzo de 1996, surgió la Enfermedad de *Creutzfeldt Jacob* nueva variante (ECJv), que se asoció con la EEB espacial y temporalmente (Knight, 1999). Sin duda por este hecho la EEB adquirió mayor relevancia, ya que fue considerada una zoonosis que demandó la elaboración de sistemas de vigilancia epidemiológica en muchos países (WHO, 2002).

Es justamente por la mejora en los sistemas de vigilancia y los métodos de diagnóstico que se ha detectado la enfermedad en 24 países de 3 continentes: Europa, Asia y América (OIE, 2004a). A estos avances, también se le adjudica la detección de la enfermedad en los Estados Unidos (CDC, 2004).

Por esta razón, el diagnóstico de la EEB es un tema primordial en esta tesis, pero se considera que para entender cómo se determina la infección por agentes priónicos es importante hacer un recuento sobre la naturaleza del agente y su patogénesis.

### **1.1.1. Generalidades sobre los priones y patogénesis**

La proteína priónica normal (PrP<sup>c</sup>) es una sialoglicoproteína que posee una masa molecular de 33-35 KDa. Es sintetizada en el retículo endoplasmático, modificada en el aparato de Golgi y transportada hacia su posición definitiva en la superficie celular (Weissman et al., 2002). Una alteración en la conformación de la PrP<sup>c</sup> es el origen de un prión anormal (PrP<sup>sc</sup>), que cambia su masa molecular a 27-30 KDa (Palencia, 1998), adquiere las características de tinción del amiloide, se torna insoluble y resistente a la proteinasa (WHO, 2002). Esta última habilidad de los priones los faculta para sobrevivir en su paso por el tracto digestivo, donde las células M, que son portales para antígenos y patógenos, sirven de mediadoras en su transporte hasta las placas de Peyer en el íleon (Weissman et al., 2002), único lugar fuera del SNC donde se ha detectado la PrP<sup>sc</sup> en la EEB (Taylor, 1996). Se cree que, posiblemente, los priones siguen su camino al cerebro vía las fibras simpáticas de nervios del sistema nervioso autónomo, que lo conectan con la médula espinal torácica media. De ahí el agente viaja a una velocidad máxima de 1mm por día (WHO, 2003) hasta llegar al cerebro, donde el prión anormal (PrP<sup>sc</sup>) se acumula intracelularmente en el retículo endoplasmático (Collins et al., 2004) y en los lisosomas (Koo et al., 2001), provocando así los cambios histológicos irreversibles en la masa encefálica y, como consecuencia, la enfermedad (FAO, 2004). Una vez que el agente infeccioso ha alcanzado el cerebro y el médula espinal, puede pasar a tejidos periféricos (WHO, 2003).

### **1.1.2. Signos clínicos en la EEB**

La EEB se caracteriza por producir signos clínicos predecibles y seguir un curso insidioso en animales adultos, de 20 meses a 18 años (Bradford, 2002). Se distingue por causar alteraciones en el comportamiento, la locomoción (anormalidades de la postura y el

movimiento) y la sensibilidad (hipersensibilidad al toque, al sonido y a la luz) (Bradley, 1990; Braun et al., 1998). Sin embargo, la EEB causa un desorden difuso del SNC, por lo que la presentación clínica puede mostrar considerables variaciones (Briggs, 1999). Esto hace difícil diferenciarla de otras patologías del SNC en bovinos como son: la rabia, listeriosis, pseudorabia, migraciones de parásitos en el SNC (Briggs, 1999; Wells et al., 1995), amibiasis (Van der Lugt y Van der merwe, 1989; Fuentealba et al., 1992; Gutierrez, 2000), abscesos del SNC, tumores intracraneales, polioencefalomalacia (exceso de sulfato) y patologías que causan síntomas nerviosos como las intoxicaciones (organoclorados, oxalato, arsénico, envenenamiento agudo por plomo, mercurio), cetosis nerviosa, hipomagnesemia, hipocalcemia, encefalopatía urémica y hepática y la babesiosis (Briggs, 1999; Wells et al., 1995). Algo que permite distinguir la EEB de patologías como las anteriores, es su largo período de incubación (32 a 40 meses) y su prolongada duración clínica (1 a 6 meses) (Bradford, 2002).

### **1.1.3. Pruebas de diagnóstico**

#### **1.1.3.1. Hallazgos histopatológicos en la EEB**

La histopatología es la forma convencional de diagnóstico. En Costa Rica se ha venido utilizando desde el año 2001 como parte del proceso de demostración de la ausencia de la EEB, bajo la tutela del Programa de Vigilancia y Seguimiento Continuo de la EEB (DSA, 2003a).

La EEB es causada por un agente atípico y las lesiones histológicas que produce son distintas a las que causan otros agentes infecciosos (virus, bacterias y protozoarios) (Cheville et al., 1999). Su diagnóstico se basa en la visualización de tres cambios morfológicos que

caracterizan a las EETs en localizaciones específicas del tejido nervioso. En el examen histopatológico esta triada la componen:

1. Los cambios espongiiformes, que consisten en: vacuolización del pericarion neuronal en forma de vacuolas con apariencia redonda u ovoide individuales o múltiples y sin contenido, dilatación focal de los procesos neuronales (principalmente de las dendritas) y cambios espongiiformes en el neuropilo de la materia gris (Wells et al., 1987; Fatzer et al., 1996).
2. La degeneración neuronal (más evidente en las enfermedades humanas).
3. La astrocitosis (principalmente en casos de *scrapie*) (Hadlow, 1999).

Las lesiones de EEB se evidencian con más frecuencia en el obex, a nivel del núcleo del tracto solitario y el núcleo del tracto espinal del nervio trigémino (Hadlow, 1999). Este perfil característico permite diferenciar con propiedad las encefalopatías de las encefalitis, ya que esta última tiene como sello distintivo la migración de leucocitos de la sangre periférica al neuroparénquima (Summer et al., 1995).

#### 1.1.3.2. Otras técnicas de diagnóstico

Aún no hay pruebas para diagnosticar la EEB en animales vivos. El uso de ratones para realizar bioensayos rutinarios no es práctico, ya que el período de incubación del agente es de varios meses, aunque éste es el único método disponible, hoy en día, para la detección de la infectividad (OIE, 2004a).

En la actualidad, se utiliza con profusión la inmunohistoquímica (IHQ), una técnica de inmunolocalización muy sensible que utiliza anticuerpos marcados para demostrar los patrones característicos de acumulación de la PrPres (Boenish et al., 2002). Está

internacionalmente aceptada y descrita en el “Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees)” de la OIE (OIE, 2004b).

Otras herramientas de diagnóstico como la visualización mediante microscopía electrónica de las fibras asociadas a *scrapie* (Gibson, 1987), el *Western blot* y las técnicas de ELISA, requieren confirmación del resultado con el examen histopatológico y de IHQ del cerebro fijado (Ariza, 2002).

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

La EEB en Costa Rica, es considerada una enfermedad exótica. Sin embargo, el país ha sido calificado en la categoría II del Comité Director Científico de la Unión Europea (SSC por sus siglas en inglés), lo que significa que no se puede descartar la probabilidad de que ocurra EEB en bovinos nativos (WTO, 2003). Esta calificación se justifica porque en el país, entre 1980 y 1996, se realizaron intercambios de animales y harinas de carne y hueso de países con casos de EEB (DSA, 2003a).

No fue sino hasta el año 2001 cuando se crearon los decretos ejecutivos que enunciaron que la enfermedad era de declaración obligatoria (29282-MAG y 29285-MAG-S). Se prohibió la importación de animales, sus productos y subproductos de países afectados o potencialmente afectados con EEB destinados al consumo humano y animal (DSA, 2003a). Dentro de las medidas tomadas en el país, se propuso realizar una vigilancia activa de la EEB en el hato bovino. El Programa de Vigilancia y Seguimiento Continuo de la EEB, ha sido diseñado para detectar la enfermedad si llegara a presentarse en el país, y para certificar sus resultados con fundamento científico por medio de la vigilancia histológica, de una cantidad representativa de casos anuales (DSA, 2004b). Para realizar esta investigación fueron recopilados y analizados los casos que formaron parte de este Programa durante el año 2003, se determinaron las enfermedades del SNC más frecuentes, y se logró además, proveer los resultados y enseñanzas adquiridas con la realización de la prueba de IHQ para detección de la PrPres en cerebros.

### **1.3. OBJETIVOS**

#### 1.3.1. Objetivo general

Realizar un análisis etiológico sobre las enfermedades del sistema nervioso central de bovinos que fueron recibidos para diagnóstico histopatológico durante el año 2003 en el Servicio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional (UNA).

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- 1.3.2.1. Descartar las lesiones de EEB por medio del examen histopatológico y por IHQ en las muestras de encéfalos.
- 1.3.2.2. Conocer cuáles son los diagnósticos diferenciales de EEB en las muestras procesadas.
- 1.3.2.3. Implementar la técnica de IHQ para diagnóstico de la EEB.
- 1.3.2.4. Determinar cuáles son las lesiones encefálicas y diagnósticos histopatológicos más frecuentes de los casos recibidos.

## **2. METODOLOGÍA**

### **2.1. Población: tamaño, origen y recolección de la muestra**

Las muestras procesadas comprendieron 108 encéfalos de bovinos, que fueron recibidos por el Servicio de Patología de la UNA durante el año 2003. Estos forman parte del programa de vigilancia de la EEB del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), cuyo número se calculó de acuerdo con los criterios señalados por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), quien determinó que, a Costa Rica le correspondía analizar al menos 99 muestras (OIE, 2003). Estas debieron incluir las de animales sospechosos de infección con EEB, que según el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE (2003) son los bovinos mayores de 30 meses afectados por una enfermedad que se resiste a todo tratamiento y que manifiestan anomalías progresivas de comportamiento, también los que presentan síntomas neurológicos sin haber manifestado signos de enfermedad infecciosa. Además, se deben incluir los casos supuestos de rabia y los que mueren con otros signos neurológicos progresivos, asimismo, casos de bovinos que han muerto o han sido sacrificados por razones ajenas a la matanza rutinaria, que incluyen los animales hallados muertos y los sacrificados en condiciones de emergencia (OIE, 2003).

Del total de muestras recibidas, 73 correspondieron a bovinos que manifestaron signos de problemas nerviosos. Abarcan 64 muestras remitidas por veterinarios autorizados por el MAG y 9 muestras recibidas directamente en el Servicio de Patología de la UNA, remitidos por veterinarios privados. La cifra se complementó con 35 muestras de animales procedentes de tres diferentes mataderos del país (Anexo 1) (DSA, 2003a).

De las 108 muestras evaluadas, se recopiló información pertinente tal como la edad, el sexo y la raza de los animales (Anexo 2, 3, 4), el lugar de procedencia del bovino (Anexo 1),

el tipo de muestra suministrada (necropsia o necropsia parcial), la fecha de la recolección, forma de muerte (eutanasia o natural), estatus de vacunación y sintomatología presentada.

En 9 de los casos que ingresaron directamente al Servicio de Patología, se pudo realizar una evaluación macroscópica del tejido fresco, posterior a la extracción del encéfalo (Dahme y Weiss, 1989). En estos casos, el cerebro pudo ser removido dentro de los 60 minutos posteriores a la muerte y mantenido en condiciones ideales (Foley y Zachary, 1995). Las lesiones visibles en los tejidos frescos fueron fotografiadas, para su respectiva documentación. Se utilizó una cámara Leice R7 y rollos de película para diapositivas Fuji 100. Los cerebros de animales con síntomas clínicos y los procedentes de mataderos, fueron enviados en frascos de formalina al 10%. En 15 casos las muestras fueron recibidas en condiciones de manejo inadecuadas (congelados o en bolsas) para el análisis histopatológico.

## **2.2. Procesamiento, análisis e interpretación de la muestra**

### **2.2.1. Análisis histopatológico**

Para el estudio microscópico de los encéfalos se realizó un abordaje histopatológico estándar, en que se utilizaron áreas representativas de éstos (OIRSA, 2002; OIE, 2004a). Los cerebros fueron cortados en seis segmentos con un cuchillo, a las secciones tomadas se les asignó un número que corresponde: 1 a la médula oblongada (óbex), 2 al puente, 3 a el cerebelo, 4 al hipocampo-tálamo, 5 a la corteza cerebral occipital y 6 a la corteza frontal. En los casos pertinentes se realizaron cortes adicionales (por ejemplo: la médula espinal y el nervio trigémino) y si la muestra no permitía la evaluación de todas estas regiones, solo se tomaban las que eran posibles. El tejido debió permanecer almacenado en formalina al 10% por dos semanas. Se tiñeron con hematoxilina y eosina (García, 1993) y fueron observados en un microscopio óptico (OLYMPUS BH2/ PM10AD). Se practicaron otras tinciones especiales

en casos que son de ayuda en el diagnóstico, como la tinción de Giemsa, Ziehl Neelsen, Grocott y Gram.

Durante el análisis histopatológico se anotaron las lesiones que se consideraron importantes indicadores de inflamación, como el agregado perivascular mononuclear o polimorfonuclear, presencia de gliosis, satelitosis, neuronofagia, presencia de meningitis, hallazgo de inclusiones o vacuolas intraneuronales y posibles agentes etiológicos.

Los resultados de la evaluación microscópica fueron tabulados con la utilización de los adjetivos; leve, moderado y severo, para denotar en forma semicuantitativa (Armién, 2000) la gravedad de la encefalitis, la meningitis, la vacuolización y la cantidad de inclusiones intracitoplasmáticas (corpúsculos de Negri) halladas. Cada grado de severidad fue representado por medio de – y + (Armién, 2000), como sigue:

La clasificación de caso severo (+++) se dio donde el infiltrado perivascular estaba formado por muchas capas de células mononucleares o de otro tipo de células y presencia de gliosis y satelitosis en forma evidente. También se consideró severa la presencia de cantidades incontables de inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas compatibles con corpúsculos de Negri. Asimismo cuando la vacuolización estaba muy difundida.

Moderados (++) eran los casos donde el infiltrado perivascular era menos extenso, pero siempre considerablemente significativo, por ejemplo, cuando los manguitos perivasculares constaban de dos capas de células. De la misma manera, si los corpúsculos de Negri estaban bien definidos pero en cantidades contables y si la vacuolización se presentaba en forma menos diseminada en las neuronas.

Casos leves (+) eran aquellos donde apenas existía evidencia perceptible de inflamación, el infiltrado perivascular estaba formado por una capa de células o menos, las inclusiones

intraneuronales eran esporádicas y detectadas en pocas neuronas y la vacuolización en escasas neuronas.

Si en la muestra no se detectaba alguno de los cambios anteriormente descritos se definía como negativa (-). Cuando se encontraron dentro de las evaluaciones histológicas hallazgos tales como: pigmento ceroides, pigmento en las meninges, hemorragias, vasculitis u otros, fueron anotadas pero no clasificadas.

Las lesiones microscópicas más importantes fueron fotografiadas para su documentación, con un microscopio óptico (OLYMPUS BH2/ PM10AD) y rollos de película Fuji Velvia 50.

#### 2.2.2. Técnica de IHQ para detección de la PrPres

Para este estudio se sometieron 34 encéfalos a la técnica de IHQ. Las muestras pertenecían a 2 animales con rabia, 7 bovinos de matadero, 2 cerebros autolíticos y el resto eran casos negativos a rabia que presentaban vacuolización intraneuronal (23 casos). De estas 34 muestras, siete eran bovinos jóvenes (de 12 a 30 meses), pero principalmente se incluyeron animales adultos (27 casos, mayores de 30 meses), pues la enfermedad afecta más este grupo de edad (OIE, 2003). Los cortes seleccionados fueron secciones de la médula oblongada (24 casos) y el puente (10 casos).

El método utilizado en este estudio se conoce como tecnología LSAB (método de estreptavidina-biotina marcada) (Boenish et al., 2002). Se basa en una reacción antígeno anticuerpo, y consiste en incubar el antígeno que se desea detectar (epitopo específico en la PrPres), frente a un anticuerpo (anti-PrPres) marcado con biotina, que se une a la estreptavidina de un conjugado marcado con la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) y la reacción se visualiza con el sustrato cromógeno DAB (diaminobencidina) (Boenish et al.,

2002). El protocolo de IHQ empleado se basó en procedimientos operacionales estándar para detección de PrPres en cerebros, usando el *kit Pullman TSE IHC/99-DAB* (WMRD, Inc, Pullman, WA. USA) y el sistema Shandon.

1. Inicialmente, las muestras fueron preparadas según los procesos habituales usados en histopatología (García, 1993), pero con portaobjetos con carga eléctrica (Thermo Shandon). En estos portaobjetos los tejidos fueron incubados en ácido fórmico al 95% por 1 minuto. Se utilizó el tampón Tris-HCl, 0,1 M, pH 7.6 para regular el pH final de las muestras (12.1gr de tris base (SIGMA), 800 ml de agua destilada, HCl al 37%).

3. Luego se realizó un “rescate” en el cual se transfirieron los portaobjetos a un recipiente resistente al calor, el cual contenía solución de rescate o “target retrieval solution”, pH 6.1. De esta manera, se incubaron en una autoclave a 120°C por 20 minutos y se dejaron enfriar en el líquido por 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez fríos, a los tejidos se les cambió la solución de rescate por el tampón *tris salina con tween 20* (TBST) (6.06gr tris base (SIGMA), 17.50gr NaCl, 1ml de tween 20, 800ml de agua destilada) y se mantuvieron en esta solución por 12 horas, para ser trasladados al Hospital San Juan de Dios (HSJD) donde se realizó la prueba de IHQ.

4. A continuación, las muestras se colocaron en un soporte de portaobjetos para realizar la inactivación de la peroxidasa endógena. Para este fin, se incubaron los tejidos en agua oxigenada al 3% por 10 minutos. Para evitar que siguiera el proceso de reacción de la peroxidasa con los tejidos, los portaobjetos fueron enjuagados sumergiéndolos dos veces en agua destilada por 30 segundos a 1 minuto.

5. El portaobjeto con el tejido se colocó dentro del soporte de portaobjetos del sistema Shandon, se formó un pocillo donde los reactivos estaban en contacto con el tejido. En el

pocillo se agregó 100ul de solución de proteinasa K por un minuto. Seguidamente, se agregó 100ul de anticuerpo monoclonal F99/97.6.1 (VMRD. Inc. Pullman, WA, USA), diluido 1:100 en diluyente de anticuerpo (Pullman TSE-IHC/99, VMRD. Inc. USA), para obtener una concentración final de 10ug/ml. Este anticuerpo primario, reconoce un epitopo (residuo QYQRES) en la PrPres en tejidos de rumiantes (ovejas, vacas, ciervos, alces) (Spraker et al., 2002; Valdez et al., 2003).

6. Se colocaron 100ul de anti-ratón IgG-biotina o anticuerpo secundario biotinilado. Luego se agregó 100ul de estreptavidina-HRP marcada con la enzima, que es la solución que proporciona el color. Posteriormente, se añadieron 500ul de DAB sustrato-cromógeno. (Entre cada paso de los puntos 5 y 6 se realizaron enjuagues con 2ml de TBST una vez por 5 minutos).

7. Finalmente, se realizó la tinción de contraste con hematoxilina, la deshidratación y el montaje. Se observó y leyó al microscopio de luz.

Como control positivo se utilizaron secciones del puente, médula oblongada y cerebelo de una oveja inoculada con *scrapie*, facilitado por PANAFTOSA y se utilizó el mismo tejido como control negativo pero con un anticuerpo primario negativo [IgG<sub>1</sub> Subclass Specific (ER/PR System, DAKO Corporation, USA)].

Los resultados de la prueba de IHQ en las muestras, fueron interpretados por la especialista en esta técnica del HSJD. Se consideraron positivos aquellos casos que presentaban una inmunotinción específica, consecuencia del precipitado color marrón resultante de la interacción del sustrato de la enzima con el cromógeno (Boenisch et al., 2002). Específicamente por la acumulación de PrPres en el tejido que produce patrones de tinción que

pueden ser evaluados detalladamente con la técnica de IHQ (González et al., 2003). Estos patrones se presentan como:

1. Patrón en gránulos finos en el pericarion de las neuronas: visualizado como gránulos dispersos en el citoplasma neuronal o perineural.
2. Patrón difuso-sináptico: que se observa como un agregado granular o punteado por la deposición de PrPres a través del neuropilo (González et al., 2003).
3. Patrón asociado a la glia (McGuill y Wells, 1993; González et al., 2003).
4. Patrón perivacuolar, el ependimal, y el de placas amiloide-PrP (Hadlow, 1999; González et al., 2003).

### **2.3. Técnicas adicionales**

#### 2.3.1. Técnica de inmunohistoquímica (IHQ) en una meningo-encefalitis piogranulomatosa.

En un encéfalo con inflamación piogranulomatosa severa, se realizó la prueba de IHQ con la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) para detección de la bacteria *Listeria monocytogenes*. La prueba se llevó a cabo en el Instituto de Patología Veterinaria de la Universidad *Justus Liebig* en Giessen, Alemania.

#### 2.3.2. Técnica de inmunohistoquímica en un tumor cerebral (IHQ)

Un caso de un tumor cerebral fue referido al Instituto de Patología Veterinaria de la Escuela Superior de Medicina Veterinaria (TiHo) en Hannover, Alemania, donde se realizó la prueba de IHQ para detección de vimentina, proteína S-100, sinaptofisina y proteína ácido fibrilar glial (GFAP).

### 2.3.3. Técnica de inmunofluorescencia (IF) para rabia

Se recopilaron los resultados de la prueba de inmunofluorescencia realizada en 69 bovinos que presentaron sintomatología nerviosa. Los datos fueron aportados por la Sección de Diagnóstico de Rabia, Dirección de Salud Animal, MAG. La técnica de diagnóstico utilizada en Costa Rica, se basa en la elaborada por el Centro Panamericano de Zoonosis (Atanasiu, 1965; Jiménez, 2005). Es un método directo, donde improntas del tejido cerebral a nivel del cuerno de Ammon (hipocampo) son fijadas en portaobjetos y se tiñen con un conjugado específico (conjugado fluorescente anti-rabia) (OIE, 2004b).

### 2.3.4. Técnica de inmunohistoquímica enzimática para rabia (IHQ)

En 17 casos sospechosos de rabia las muestras fueron referidas al Instituto de Patología Veterinaria de la Universidad *Justus Liebig* en Giessen, en Alemania, donde se realizó una prueba de IQH, con la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) para la detección de antígeno viral.

### **3. RESULTADOS**

#### **Datos anamnésicos**

De los 108 cerebros de bovinos evaluados, 73 correspondieron a casos clínicos que presentaban sintomatología de tipo nervioso (Anexo 1). Solo fue posible evaluar los síntomas en 56 de estos casos, por ser los únicos en los que se detalló la historia y la clínica exhibida (Cuadro 1). En los 17 restantes se reportó que el animal presentaba sintomatología nerviosa pero no se mencionaban los signos clínicos mostrados.

De los 56 casos en que se reportaron síntomas, los trastornos más frecuentes fueron, en primer lugar, las alteraciones locomotoras ya que el síntoma predominante fue la ataxia, que se dio en 31 bovinos (55.6%), así como la postración en 17 casos y parálisis posterior en 19 casos. En segundo lugar de frecuencia se encontró el tialismo en 27 animales, que corresponde al 48.2% (Cuadro 1). El tialismo y la ataxia fueron también los síntomas más comunes en animales con rabia pues se detectaron en 13 (86.7%) de los 15 casos en que se reportó una historia completa (Cuadro 2).

#### **Hallazgos histopatológicos preliminares**

En el examen histopatológico la lesión más frecuente fue el infiltrado mononuclear perivascular en el espacio de Virchow-Robins que se presentó en 50 (46.3%) de los 108 bovinos (Cuadro 3). Este porcentaje abarca desde los casos en que el infiltrado fue muy severo y diseminado, hasta aquellos casos en los que la lesión fue leve y localizada. En este mismo análisis, se observó que 27 animales (25%) del total de casos analizados (108) presentaban satelitosis y gliosis, muchas veces asociado a un proceso inflamatorio en el SNC o encefalitis

(Cuadro 3). La región más severamente afectada con inflamación fue la médula oblongada (17.4%) y el cerebelo (16.4%) (Cuadro 4).

La inflamación de las meninges fue menos frecuente que la encefalitis, pues solo se observó en 19 casos (17.6 %) (Cuadro 3). El grado leve de meningitis fue el más común pues se produjo en forma muy uniforme entre cada localización (Cuadro 4).

### **Lesiones compatibles con EEB e IHQ para detección de PrPres**

En la población evaluada, se detectó la presencia de vacuolización en el pericarion de las neuronas en 34 casos (31.5%) (Cuadro 3). El cerebelo (20.5%) y el puente (19.6%) son las secciones en que se encontraron frecuentemente (Cuadro 4).

Con el fin de descartar la presencia de proteína priónica anormal (PrPres) se realizó la prueba de IHQ en 34 secciones de tejidos de diferentes cerebros (Figura 1). En estas muestras no se hallaron evidencias de inmunotinción específica que indicaran acumulación de PrPres.

### **Diagnósticos histopatológicos**

En 25 de los 36 casos en los que se encontraron lesiones inflamatorias no supurativas y consistentes con encefalitis mononuclear, pudieron atribuírsele a la rabia. En los 11 casos restantes los hallazgos no pudieron ser adjudicados a ningún agente etiológico específico (Cuadro 5).

En dos animales el tipo de reacción inflamatoria fue compatible con una encefalitis de origen bacteriano. En uno de estos se diagnosticó por medio de IHQ la presencia de *Listeria monocytogenes* (Figura 2). En otros tres bovinos se observó una inflamación de tipo granulomatosa. En uno de los casos la etiología de la lesión se le adjudicó por su morfología a una especie de ameba de vida libre denominada *Naegleria fowleri* (Figura 3); sin embargo,

para llegar a un diagnóstico definitivo será necesario realizar estudios más detallados. Otro caso presentó un crecimiento neoplásico en las meninges. El tumor fue clasificado con base en su morfología y la IHQ como un sarcoma de las meninges (Cuadro 5; Figura 4).

### **Hallazgos histopatológicos y pruebas adicionales en casos de rabia**

De las 69 muestras de encéfalos en que se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia (IF) para detección de rabia, se confirmó la enfermedad en 26 casos (37.7%) (Anexo 1). De la evaluación histopatológica de estas muestras, se obtuvo que el hallazgo más frecuente era la presencia de infiltrado mononuclear perivascular, encontrada en 25 animales (96.2%). Otras lesiones frecuentes fueron la gliosis en 18 casos (69.2%) y la satelitosis en 13 (50%) (Cuadro 6 y Figura 5). Se pudo percibir que en los casos de rabia el grado de encefalitis era severo, afectando principalmente al puente (56.3%), seguido por el hipocampo (47.1%) y la médula oblongada (45%) (Cuadro 7). Por el contrario, el grado de meningitis tendía a ser de leve a moderada sobre todo en la corteza occipital (75%) (Cuadro 7).

Fue un hallazgo común en los casos de rabia observar vacuolas intraneuronales ya que se detectaron en 12 (46.2%) de 26 casos (Cuadro 6). Se ubicaron con más frecuencia en el puente (31.3%) y la corteza frontal (40%), pero en escasas neuronas (Cuadro 7).

Las inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas en los casos de rabia, se detectaron en 23 (88.4%) de los casos (Cuadro 6, Figura 6). De las secciones de tejido analizadas, se encontraron con más frecuencia en el puente (87.5%), donde lo común fue que se diera en forma severa (43.8%).

De los resultados de la prueba de IHQ para rabia efectuado con la técnica de peroxidasa anti-peroxidasa PAP en 17 muestras. En 14 se obtuvo un resultado positivo, que coincidió con

los resultados de la inmunofluorescencia. Dos casos fueron negativos en las dos pruebas. Un caso que fue positivo en la IF para rabia y fue negativo con la PAP (Figura 6).

#### 4. DISCUSIÓN

Como consecuencia del surgimiento de la EEB y al reconocerse a nivel mundial y nacional su condición de enfermedad zoonótica, se dio un auge en los estudios acerca de las enfermedades del SNC de los bovinos y en el desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico. Pero a pesar de los avances en este último campo, para la EEB los signos clínicos continúan siendo la única forma de detección *antemortem* (Braun et al., 1998). Por esta razón se consideró importante evaluarlos en este estudio; sin embargo, de su análisis se pudo concluir que en 56 de los casos la sintomatología reportada era inespecífica; es decir, no necesariamente indicaban alteraciones en el SNC porque pueden presentarse en una gran variedad de desórdenes clínicos (Braun et al., 1998). También se evaluó la duración de la enfermedad. En los casos en que se reportó este dato se trataba de procesos agudos no compatibles con la cronicidad típica de la EEB (Wells et al., 1994). La presentación aguda por el contrario es compatible con enfermedades como la rabia, la listeriosis entre otros desórdenes (Briggs, 1999).

Además, no es del todo adecuado basarse solamente en los síntomas para dar un diagnóstico como se hace en regiones donde hay alta incidencia de la enfermedad, principalmente por la existencia comprobada de otra cepa para la EEB (Lloyd et al., 2004) (como se reportó en Japón) (Yamakawa et al., 2003; Lloyd et al., 2004). Por lo que es poco prudente hacerlo de igual forma en Costa Rica, donde la enfermedad aún no ha sido diagnosticada.

Por estas razones, el método de diagnóstico utilizado en la actualidad y en esta investigación para descartar la EEB es la evaluación histopatológica, fundamentada en la

detección de lesiones patognomónicas de la EEB en los tejidos, establecidas así desde la descripción por Wells et al. (1987).

Como resultado del análisis se pueden señalar las siguientes conclusiones: las lesiones simétricas y bilaterales características de la EETs no fueron detectadas en las muestras. En efecto, las vacuolas halladas fueron esporádicas e individuales, no fueron múltiples ni en las neuronas como las descritas para la EEB. Tampoco la localización de las lesiones correspondía con la literatura, que indica el óbex como el lugar donde se detecta la vacuolización con mayor frecuencia (en 99.6% de los casos de EEB) (OIE, 2003a). Contrariamente, de las 69 muestras evaluadas, sólo 9 casos (13%) presentaron vacuolas en esta sección. Así mismo, el cerebelo, que usualmente se ve poco afectado en casos de EEB (Ariza, 2002; OIE; 2003a), en los presentes casos fue la región donde se dio con mayor frecuencia la vacuolización (Cuadro 4).

Es importante tomar en cuenta que lesiones vacuolares pueden ser causadas por otros agentes. Por ejemplo, en casos de rabia se pueden hallar lesiones espongiiformes que son indistinguibles cualitativamente de las lesiones características de las EETs. Estas fueron descritas, por primera vez, en casos experimentales de rabia en mofetas y zorros (Charlton, 1984) y después, en la enfermedad natural en vacas, mofetas, zorros, caballos, ovejas y gatos (King y Turner, 1993; Charlton, 1988). Las lesiones ocurren en las dendritas neuronales como vacuolas intracitoplasmáticas rodeadas por una membrana y con menor frecuencia se dan en los axones, el pericarion y en los astrocitos (Charlton, 1988; Foley y Zachary, 1995).

En casos de rabia las lesiones espongiiformes se diferencian de las causadas por la EEB por ser de menor extensión y porque las vacuolas son más grandes que las producidas por priones (2-60  $\mu\text{m}$  en casos de rabia y 2-25  $\mu\text{m}$  en la EEB). También se pueden distinguir

porque los cambios vacuolares que causa la rabia se acompañan de una reacción celular inflamatoria e inclusiones (Chopra et al., 1980; Foley y Zachary, 1995). Sin embargo, Foley y Zachary (1995) indican que no se puede descartar que ocurran casos de rabia donde haya vacuolización, pero los corpúsculos de Negri y la inflamación estén ausentes.

Otra diferencia es la localización de los cambios espongiiformes. En la rabia afectan más severamente el tálamo y la corteza cerebral (King y Turner, 1993; Foley y Zachary, 1995), lo que concuerda con los casos evaluados en este estudio, pues fueron la corteza cerebral frontal (40%) junto con el puente (31.3%) las regiones más afectadas (Cuadro 7). Por otro lado no coincide con la EEB que, como se mencionó anteriormente, afecta más severamente el óbex (Willesmith et al., 1988). Existen trabajos que indican que estas lesiones causadas por la rabia raramente afectan el hipocampo y el hipotálamo (Bundza y Charlton, 1988). Por el contrario, en este estudio, las vacuolas se hallaron en forma habitual en el hipocampo de los animales con rabia (29.4%) (Cuadro 7).

También se debe tomar en cuenta que las lesiones vacuolares pueden ser causadas por desórdenes tóxicos y metabólicos, como es el caso de la encefalopatía hepática que muestra importantes diferencias de las lesiones causadas por priones (Jeffrey, 1992; Jubb et al., 1993). La principal diferencia es que las alteraciones se dan a nivel de la mielina y tienen una distribución multifocal (Jubb et al., 1993). Del mismo modo, se pueden observar lesiones similares a las EETs en las enfermedades de almacenamiento lisosomal (Jubb et al., 1993; Summers et al., 1995) y en tejidos autolíticos. En estos casos la vacuolización se produce al incluir en parafina los tejidos de donde el material almacenado es extraído o no se tiñen durante el procesamiento de las muestra (Wood et al., 1997; Spraker, 2002). La vacuolización es además, un hallazgo normal en ciertas localizaciones del SNC como en el núcleo rojo, la

formación reticular, el núcleo habenuar y en el núcleo óculomotor, donde se pueden encontrar numerosas neuronas con vacuolas individuales (Jubb et al., 1993; McGuill y Wells, 1993).

Lo anteriormente expuesto, permite comprender el porqué en muchos casos el examen histopatológico no es conclusivo y se puede deducir la necesidad de utilizar otras técnicas como la IHQ para realizar el diagnóstico (OIE, 2004a).

En este estudio, la prueba fue realizada en 34 secciones de la médula oblongada cortadas a nivel del óbex y del puente. Estas secciones fueron seleccionadas porque es bastante conocido que el cerebro medio, el tronco del encéfalo y la médula espinal son las regiones más afectadas con vacuolización en las EETs (Fenner et al., 1993), por lo tanto, presentan más acumulación de la PrPres (Wells et al., 1994).

La presencia de PrPres en el cerebro produce patrones de tinción que pudieron ser observados en el tejido de una oveja utilizada como control positivo (Figura 1), pero no en las muestras analizadas, lo que permitió descartar la presencia de priones anómalos en los tejidos. En este caso de *scrapie*, la inmunotinción se observó en forma de un patrón intraneuronal y en un patrón difuso-sináptico, que son, junto con la forma asociada a la glía, los que se presentan en casos de EEB (González et al., 2003). El patrón perivacuolar solo es detectable en casos severos, por esta razón fue localizado en las vacuolas más grandes del control positivo (Gonzalo y Cuadrado, 1998). Otros patrones mencionados en la literatura como la forma endosomal y el de placas amiloide-PrP son raros en la EEB y *scrapie* (Hadlow, 1999; González et al., 2003), por lo que no fueron detectados en el caso de *scrapie*.

Los patrones de tinción en las EETs son comunes o similares para cada enfermedad, y las variaciones se asocian con cambios en la conformación y el procesamiento de la PrPres que produce diferencias en el tropismo celular y, como consecuencia, cambios en la intensidad

de coloración (González et al., 1993). Por ello, como sucede en casos de *scrapie* donde existen diferentes cepas, la técnica podría detectar los casos causados por otras cepas de la EEB, en los cuales deben ser consideradas, en cada caso, las variables fenotípicas en la inmunotinción (Gonzalo y Cuadrado, 1998). Un aspecto importante es que la IHQ puede detectar la presencia de PrPres en casos donde las lesiones son mínimas pero la enfermedad está avanzada (McGuill y Wells, 1993; Wells et al., 1994), así como en animales en el período de incubación (Bradley, 1999), en cerebros autolíticos o previamente congelados (Chaplin et al., 1993; Debeer et al., 2002). Esto último podría marcar una diferencia considerable en estudios como éste, ya que, en muchas ocasiones, la calidad del material remitido no fue la mejor, por errores en el manejo de la muestra.

Después de descartar la presencia de EEB, se procedió a analizar otros hallazgos histológicos con el fin de determinar las patologías en los cerebros bovinos remitidos durante el año 2003. Se pudo establecer la presencia de una encefalitis bacteriana en dos casos. En uno se observó una meningoencefalitis piogranulomatosa severa (Figura 2), causada por la bacteria Gram positiva, *Listeria monocytogenes*. La etiología de esta lesión fue determinada por medio de la técnica de IHQ. En este caso, fue imposible realizar cultivos bacteriológicos por la ausencia de tejidos frescos (que no estuvieran fijados en formalina). Anteriormente, en hallazgos como éstos y con tejidos frescos, la listeriosis había sido diagnosticada en bovinos, caprinos y chinchillas en Costa Rica por aislamiento bacteriológico (Morales, 2005).

En los bovinos con síntomas nerviosos es posible el hallazgo de enfermedades producidas por parásitos. Tanto en los animales como en los humanos se reconocen esporádicamente las amebas como causantes de enfermedad en el SNC (Van der Lugt y Van der Merwe, 1989). En un caso de este estudio se hallaron estructuras morfológicamente

compatibles con trofozoítos de amebas de vida libre (Figura 3). La etiología se le atribuyó a *N. fowleri* por considerarse equivalente con lo que se describe para la meningoencefalitis amibiana primaria (MAP) en humanos (Hoffman et al., 1978). La distinción entre esta enfermedad de la causada por *Acanthamoeba* spp se basa en las diferencias entre el tamaño de los trofozoítos y la observación de quistes. Bajo microscopía de luz, los trofozoítos hallados eran pequeños, llegando a medir en promedio 8,4  $\mu\text{m}$ , siendo compatibles con los descritos para *N. fowleri* (7-8  $\mu\text{m}$ ) que con los grandes trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. (15 a 50  $\mu\text{m}$ ) (Gutierrez, 2000). Esta última fue descartada porque no se hallaron los quistes característicos de ésta enfermedad en los tejidos (Martínez, 1974; Fuentealba, 1992; Gutierrez, 2000).

Los neoplasmas en el SNC causan sintomatología nerviosa y constituyen una posibilidad diagnóstica que debe ser descartada en el transcurso de la necropsia. Los neoplasmas intracraneales primarios del SNC son raros (Storts y Montgomery, 2001). Sin embargo, se identificó por medio de IHQ un sarcoma de las meninges. Fue necesario utilizar esta técnica por las dificultades en la clasificación de estos tumores basado solo en la diversidad morfológica a la histología. En la IHQ, uno de los marcadores utilizados fue la vimentina, para la que el tumor expresó un 75% de reacción, indicando así su origen mesenquimal, ya que las células meningeales se originan embriológicamente del mesodermo y la cresta neural (Summer et al., 1995) lo que coincide con las descripciones meningiomas en humanos y caninos (Barnhart et al., 2002). Otros marcadores utilizados como la proteína S-100, GFAP y sinaptofisina no indican componentes estructurales normales de las células meningeales, por lo que no fueron usados en este caso y raramente se reportan en casos de meningiomas u otros tumores no gliales en los animales y los humanos (Barnhart et al., 2002; Braund, 2003).

Los efectos negativos de este tumor, se debieron específicamente a la compresión de los nervios oculomotores y la infiltración local del tejido aledaño. Además, por el crecimiento del tumor intraventricular asociado con el plexo coroideo que provocó la obstrucción del flujo normal del LCR (Figura 4).

Como se mencionó, otro posible diagnóstico diferencial de la EEB a considerar en los países de América Latina, es la rabia, porque los animales domésticos son frecuentemente afectados (Martínez, 1999).

En el país, la enfermedad es considerada endémica en los bovinos (Jiménez, 2005). En el año 2003 se presentó el brote más numeroso reportado desde 1985 (Anexo 5) (DSA, 2005). Por medio de la IF se diagnosticaron 26 bovinos rabiosos. Como resultado de la histopatología, 25 presentaron infiltrado perivascular mononuclear en el espacio de *Virchow-Robins* (96.2%). En 18 hubo gliosis (69.2%) y satelitosis en 13 (50%) (Cuadro 6 y Figura 5). Es por esta razón que se clasificaron como encefalitis de grado severo. Contrariamente, la rabia se caracteriza por producir poca infiltración inflamatoria, y las neuronas afectadas se alteran mínimamente en su morfología, a pesar de estar infectadas con el virus (Jackson, 2001; Bradford, 2002). Posiblemente estos casos eran de bovinos que estaban en una etapa tardía de la enfermedad, ya que, como indica la literatura, la severidad de la lesión es un reflejo del tiempo que el animal ha permanecido con la enfermedad clínica (Jubb et al., 1993).

Respecto al análisis de las regiones del cerebro afectadas por la rabia, se encontró que las que manifiestan más severamente lesiones son: el puente (56.3%), el hipocampo (47.1%) y la médula oblongada (45%) (Cuadro 7). Esto coincide con los hallazgos de Chopra et al. (1980) y Chung (1999) que indican que los cambios patológicos más severos ocurren en el tronco del encéfalo (puente y médula oblongada). La literatura afirma también, que la corteza cerebral

solo sufre una leve inflamación, esto es equivalente a lo que se confirmó en los casos evaluados (Summer et al., 1995). Igualmente la meningitis, tendía a ser de moderada a leve, lo cual concuerda con las descripciones de la enfermedad, ya que las células meningeales no son el sitio blanco de la infección del virus, sino que la meningitis es resultado del drenaje de productos de la reacción inflamatoria vía el espacio de *Virchow-Robins* (Storts y Montgomery, 2001).

De los 26 animales con rabia, 23 (88.4%) presentaron inclusiones (corpúsculos de Negri) (Cuadro 6 y Figura 6). Esto es similar a lo indicado por la literatura, que señala que entre el 70 y el 80% de los animales infectados con el virus de la rabia se pueden hallar inclusiones (Jubb et al., 1993). Sin embargo, el no encontrarlos no excluye la rabia definitivamente (Chung, 1999), ya que las células afectadas solo muestran los corpúsculos de Negri después de que la deposición de las hebras que conforman la nucleocápside hayan sido suficientemente grandes como para ser detectables por medio de la microscopía de luz (Jubb et al., 1993). Además, los corpúsculos de Negri no siempre están localizados dentro de las neuronas durante el curso de esta enfermedad viral. Adicionalmente, estos son difíciles de diferenciar de otras inclusiones intracitoplasmáticas no específicas, también llamadas pseudocuerpos de Negri, que son hallados en animales normales o en forma no específica en otras enfermedades. Estos pseudocuerpos de Negri han sido observados en ovejas, gatos, ganado de carne de origen japonés, perros y ratones (Summer et al., 1995; Hooper, 1999).

Otra observación importante sobre los corpúsculos de Negri, es que tienden a ocurrir más frecuentemente en las neuronas grandes (ejemplo: neuronas piramidales de hipocampo y grandes neuronas de la médula oblongada) que en las pequeñas (Murphy et al., 1999); por el contrario, en este estudio fueron frecuentes en neuronas pequeñas como las de corteza

occipital (75% de los casos). En las células de Purkinje, frecuentemente alteradas en los herbívoros (Summer et al., 1995), fue donde se dieron con menos frecuencia las inclusiones en los casos analizados (65%) (Cuadro 7).

En algunos animales sospechosos de rabia, se realizaron técnicas de diagnóstico adicionales (IF e IHQ con la técnica PAP). En 17 muestras se efectuó la prueba de PAP, 14 casos resultaron positivos y se confirmó la rabia. En uno de los casos la reacción fue negativa en el PAP, pero positiva en la IF. Con respecto a este último resultado, se sabe que la sensibilidad de estas dos técnicas es la misma (Zimmer, 1990). Las discrepancias se presentaron al utilizar iguales técnicas con diferentes secciones del cerebro, pues investigaciones indican que la sensibilidad y especificidad del diagnóstico varía según la localización (Bingham y Van der Merwe, 2002). Estos autores hallaron que el tálamo, el puente y la médula son las regiones más fiables para el diagnóstico de la rabia. Además añaden que, especialmente el tálamo es la región que presenta mayor abundancia de antígeno (97.8 %). Asimismo, señalan que no es recomendable la utilización de una sola sección de tejido para hacer el diagnóstico, como se realiza en Costa Rica (Jiménez, 2005).

Un capítulo aparte merecen 11 casos de bovinos con historia clínica de síntomas nerviosos, pero en los que no hubo lesiones histológicas en el SNC. Para estos, se debieron considerar como posibles diagnósticos los desórdenes metabólicos, el envenenamiento agudo por plomo y el tambaleo agudo en intoxicación por *ryegrass* (*Lolium perenne*) (Summer et al., 1995), la babesiosis (Summer et al., 1995), los trastornos en las uniones neuromusculares (botulismo, tétano) y la epilepsia idiopática (Jeffrey, 1992; Summer et al., 1995). Sin embargo, la carencia de otros tejidos no permitió el análisis patológico exhaustivo de casos como los

anteriores, o se deben realizar otros abordajes para llegar a una conclusión diagnóstica (Summer et al., 1995).

En otros 10 encéfalos se halló infiltrado mononuclear perivascular (Cuadro 5) que aunque es característico de algunas infecciones virales (rabia, meningoencefalitis bovina por herpesvirus, la enfermedad de Aujeszky) (Summer et al., 1995), no pudieron ser atribuidos a ningún agente específico por la carencia de métodos de diagnóstico para su determinación.

En 20 casos las lesiones fueron poco significativas (Cuadro 5), ya que la mayoría no tienen una etiología específica particular que pueda definir una enfermedad dada. Sin embargo, es importante reportarlos porque podrían estar reflejando una infección subclínica o latente (Burna y Sánchez, 2003). De la misma forma, el examen histopatológico de los animales de matadero, no reveló lesiones o solo se encontraron hallazgos poco significativos. Nos parece, sin embargo que el análisis de tales tejidos puede tener un gran interés pues estudios similares a este en bovinos de matadero, han dado la oportunidad de observar patologías neurológicas crónicas de bovinos adultos y se han descubierto desórdenes nuevos y raros (Willesmith et al., 1992).

## 5. CONCLUSIONES

La histopatología de diferentes secciones del cerebro es una herramienta útil para el diagnóstico de la EEB en animales que presentan sintomatología nerviosa en presencia de una vacuolización evidente.

Tal y como se observó en este trabajo, la histopatología tiene la ventaja que permite la determinación de los diagnósticos diferenciales de la EEB y aporta conocimientos significativos al seguimiento activo de cuadros neurológicos de bovinos en el país.

Aún considerando lo anterior, la histopatología no es un método adecuado para animales con EEB en el período de incubación de la enfermedad, ni cuando los cambios microscópicos son mínimos o están ausentes. Esto significa que la histopatología no es una técnica apropiada para el muestreo en el matadero, ya que, en su mayoría, estos animales no presentan sintomatología nerviosa.

En situaciones como estas últimas, surge la necesidad de utilizar herramientas de diagnóstico precisas para que el sistema de vigilancia epidemiológica sea realmente efectivo. El presente trabajo introduce la técnica de la IHQ al programa que se desarrolla en Costa Rica y otorga otro recurso diagnóstico para la EEB. Sin embargo, este es solo el inicio, ya que para implementarla se debe desarrollar la capacidad técnica y adquirir un entrenamiento adecuado para interpretarla.

Con las dos herramientas utilizadas (la histopatología y la IHQ) durante el año 2003 en el Programa de Vigilancia de la EEB, fue posible descartar la presencia de la EEB en los tejidos examinados, aportando mejores bases técnicas a un diagnóstico de gran interés comercial y de salud pública.

Así mismo, se pudo demostrar que la rabia sigue siendo una de las principales patologías por descartar en bovinos con síntomas neurológicos. Otras enfermedades reportadas que pueden causar síntomas similares, como la amibiasis y las neoplasias en el cerebro son raras y se presentan esporádicamente.

Además, se constataron las dificultades para atribuir, en algunas ocasiones, las lesiones histológicas a un agente específico. Esto porque la calidad de la muestra es inadecuada o por la dificultad de utilizar técnicas específicas que permitan llegar a un diagnóstico etiológico preciso.

## 6. RECOMENDACIONES

La EEB en el país, es un peligro potencial para la salud, cuya presencia traería graves consecuencias socioeconómicas. Por esta razón se siguen las recomendaciones de la OIE, que indica que el examen histopatológico debe ser complementado con alguna otra herramienta de detección de la PrPres, como la IHQ. Esto debido a varios factores, tales como: la complejidad en la detección del agente priónico, el hecho de la existencia comprobada de por lo menos una nueva cepa para el agente de la EEB, por las diferencias en la presentación clínica y de las lesiones histológicas de la EEB. Por tanto se hace necesario la implementación de técnicas precisas y profesionales cada vez más preparados para el diagnóstico.

Se debe mejorar el sistema de recolección de datos para que, en lo sucesivo, se incluya una historia clínica detallada, con los signos y resultados de un examen clínico completo, que aporten más información a estudios retrospectivos ulteriores.

Se recomienda realizar una vigilancia activa de las enfermedades del SNC que abarquen todas las especies de rumiantes domésticos (bovinos, ovejas y cabras), con pruebas de diagnóstico más adecuadas como la IHQ. Se sugiere, considerando la diversidad de cepas que existen de *scrapie*, la variabilidad fenotípica y la facilidad con la que se trasmite en comparación con la EEB.

Para evitar que, en el futuro, se presenten brotes de rabia como el ocurrido durante el año 2003, es necesario investigar, con mayor profundidad, la epidemiología de esta enfermedad en los bovinos y en los reservorios del país; de esta manera, se podrían aplicar medidas preventivas más efectivas, que abarquen tanto la población de animales domésticos como los silvestres.

## CUADROS

**Cuadro 1. Sintomatología reportada en 56 bovinos en los que se detalla la historia clínica completa**

Signos clínicos	N° (%)
Ataxia	31 (55.4)
Tialismo	27 (48.2)
Postración	17 (30.4)
Parálisis posterior (paraparálisis)	15 (26.8)
Ceguera	11 (19.6)
Ojos vidriosos, agresividad	8 (14.3)
Otros animales con signos en la finca	7 (12.5)
Midriasis	6 (10.7)
Tetraparálisis, convulsiones	4 (7.1)
Dificultad respiratoria, debilidad, depresión, nerviosismo, tortícolis, deshidratación	3 (5.4)
Apatía, timpanismo, ictericia, opistótonos, estreñimiento	2 (3.6)
Mala condición corporal–caquexia, movimientos en círculo	
Mordida por vampiro, parto reciente, pérdida de reflejo anal	
Fiebre, hipotermia, hipoestesia, temblores, deshidratación	1 (1.8)

**Cuadro 2. Sintomatología reportada en 15 animales con historia clínica completa y confirmados como positivos para la rabia en la prueba de inmunofluorescencia.**

Signos clínicos	Nº (%)
Tialismo, ataxia	13 (86.7)
Postración, parálisis posterior (paraparálisis)	7 (46.7)
Ojos vidriosos	5 (33.3)
Ceguera, midriasis	4 (26.7)
Convulsiones, pérdida del reflejo anal	2 (13.3)
Caquexia, hipertermia, depresión	1 (6.7)

**Cuadro 3. Número y porcentaje de casos según el tipo de lesión histopatológica reportada en las 108 muestras de cerebros bovinos.**

Hallazgos histopatológicos	Nº (%)
Infiltrado perivascular mononuclear o polimorfonuclear	50 (46.3)
Vacuolización	34 (31.5)
Gliosis, satelitosis	27 (25)
Inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas	23 (21.3)
Pigmentos neuronales	20 (18.5)
Infiltrado inflamatorio en las meninges	19 (17.6)
Hiperemia	18 (16.7)
Neurofagia	17 (15.7)
Pigmentos en meninges	7 (6.5)
Hemorragia	5 (4.6)
Congestión	4 (3.7)
Vasculitis	3 (2.8)
Tumores (sarcoma de las meninges)	1 (0.9)

**Cuadro 4. Casos que presentaron encefalitis, meningitis y vacuolización intraneuronal según el número de secciones evaluadas en cada localización anatómica y el grado de severidad entre las 108 muestras procesadas.**

Localización	Encefalitis N° (%)	Meningitis N° (%)	Vacuolización N° (%)
<b>Médula oblongada (69 secciones)</b>	<b>23 (33.3)</b>	<b>9 (13)</b>	<b>9 (13)</b>
Leve	7 (10.1)	5 (7.2)	9 (13)
Moderado	4 (5.8)	2 (2.9)	
Severo	12 (17.4)	2 (2.9)	
<b>Cerebelo (73 secciones)</b>	<b>25 (34.2)</b>	<b>19 (26)</b>	<b>15 (20.5)</b>
Leve	9 (12.3)	9 (12.4)	15 (20.5)
Moderado	4 (5.5)	5 (6.8)	
Severo	12 (16.4)	5 (6.8)	
<b>Puente (92 secciones)</b>	<b>29 (31.5)</b>	<b>13 (14.1)</b>	<b>18 (19.6)</b>
Leve	15 (16.3)	5 (5.4)	18 (19.6)
Moderado	3 (3.3)	3 (3.3)	
Severo	11 (12)	5 (5.4)	
<b>Hipocampo (88 secciones)</b>	<b>32 (36.4)</b>	<b>17 (19.3)</b>	<b>9 (10.2)</b>
Leve	17 (19.3)	8 (9.1)	9 (10.2)
Moderado	5 (5.7)	5 (5.7)	
Severo	10 (11.4)	4 (4.5)	
<b>Corteza occipital (92 secciones)</b>	<b>31 (34.1)</b>	<b>19 (20.6)</b>	<b>9 (9.8)</b>
Leve	15 (16.3)	9 (9.8)	9 (9.8)
Moderado	8 (8.9)	6 (6.5)	
Severo	8 (8.9)	4 (4.3)	
<b>Corteza frontal (88 secciones)</b>	<b>27 (30.7)</b>	<b>17 (19.3)</b>	<b>13 (14.8)</b>
Leve	10 (11.4)	8 (9.1)	13 (14.8)
Moderado	9 (10.2)	4 (4.5)	
Severo	8 (9.1)	5 (5.7)	

**Cuadro 5. Diagnósticos histopatológicos de los 108 casos analizados.**

Diagnósticos histopatológicos	Nº (%)
Meningo/encefalitis mononuclear (incluye 26 casos de rabia)	36 (33.3)
Encefalitis/meningitis granulomatosa (uno de los casos por amebas de vida libre)	3 (2.8)
Encefalitis de origen bacteriano (en un caso se diagnosticó por IHQ <i>Listeria monocytogenes</i> )	2 (1.8)
Tumor (sarcoma meningeal)	1 (0.9)
Alteraciones poco significativas (pigmento ceroide, pigmentos en las meninges, vacuolización aislada)	20 (18.6)
Sin alteraciones histopatológicas	46 (42.6)
<b>Total</b>	<b>108 (100)</b>

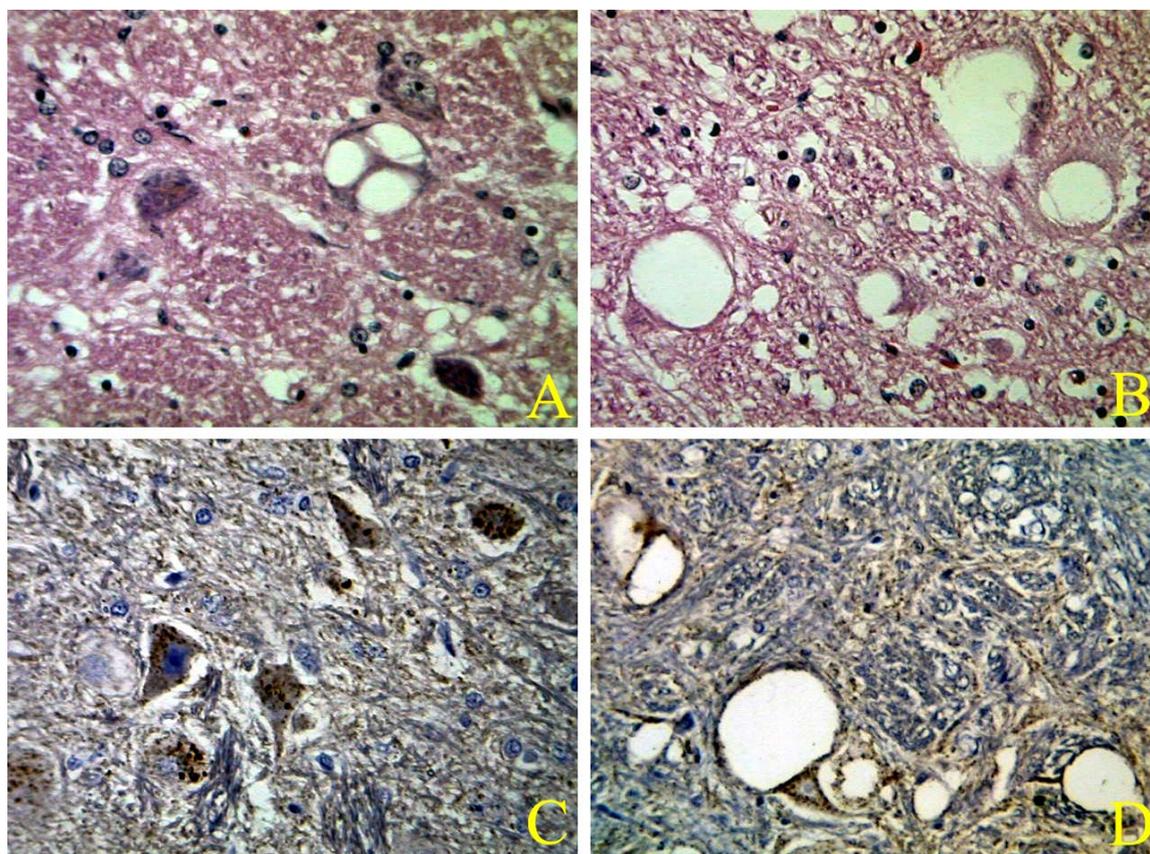
**Cuadro 6. Hallazgos histopatológicos en 26 casos confirmados por la prueba de inmunofluorescencia.**

Hallazgos	Nº (%)
Infiltrado perivascular mononuclear	25 (96.2)
Inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas	23 (88.4)
Gliosis	18 (69.2)
Satelitiosis	13 (50)
Infiltrado en meninges y vacuolización	12 (46.2)
Neurofagía	11 (42.3)
Hiperemia	7 (26.9)
Pigmentos neuronales	3 (11.5)

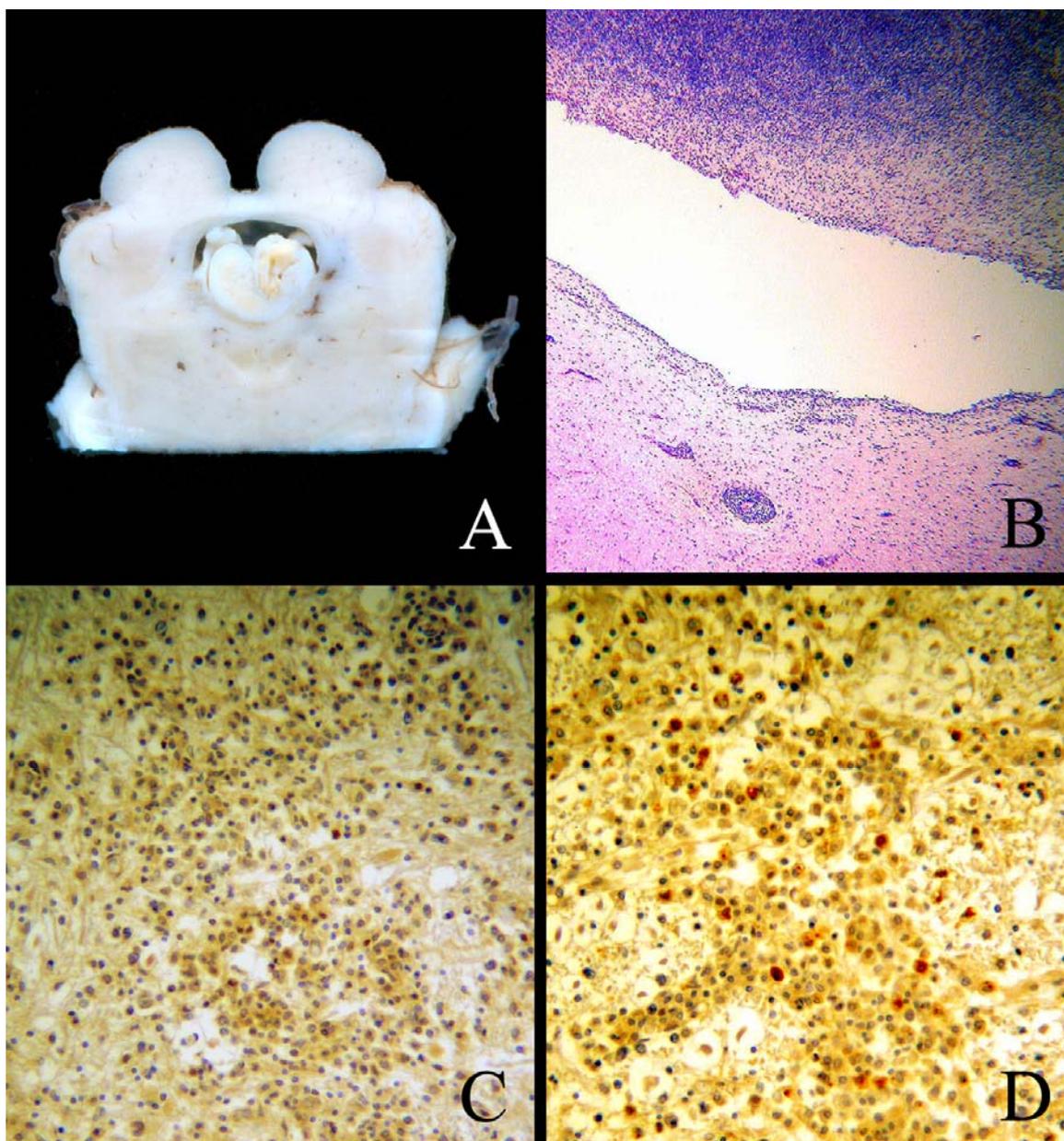
**Cuadro 7. Casos que presentaron encefalitis, meningitis, vacuolización intraneuronal e inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas (Corpúsculo de Negri) según el número de secciones evaluadas en cada localización anatómica y el grado de severidad en 26 casos positivos de rabia.**

Localización	Encefalitis N° (%)	Meningitis N° (%)	Vacuolización N° (%)	Inclusiones N° (%)
<b>Médula oblongada (20 secciones)</b>	<b>13 (65)</b>	<b>7 (35)</b>	<b>3 (15)</b>	<b>12 (60)</b>
Leve	1 (5)	3 (15)	3 (15)	5 (25)
Moderado	3 (15)	2 (10)		1 (5)
Severo	9 (45)	2 (10)		6 (30)
<b>Cerebelo (20 secciones)</b>	<b>14 (70)</b>	<b>10 (50)</b>	<b>5 (25)</b>	<b>13 (65)</b>
Leve	4 (20)	5 (25)	5 (25)	4 (20)
Moderado	2 (10)	2 (10)		3 (15)
Severo	8 (40)	3 (15)		6 (30)
<b>Puente (16 secciones)</b>	<b>16 (100)</b>	<b>10 (62.5)</b>	<b>5 (31.3)</b>	<b>14 (87.5)</b>
Leve	4 (25)	4 (25)	5 (31.3)	5 (31.3)
Moderado	3 (18.7)	3 (18.7)		2 (12.5)
Severo	9 (56.3)	3 (18.7)		7 (43.7)
<b>Hipocampo (17 secciones)</b>	<b>16 (94.1)</b>	<b>10 (58.8)</b>	<b>5 (29.4)</b>	<b>11 (64.7)</b>
Leve	6 (35.2)	4 (23.5)	5 (29.4)	4 (23.5)
Moderado	2 (11.8)	4 (23.5)		1 (5.9)
Severo	8 (47.1)	2 (11.8)		6 (35.3)
<b>Corteza occipital (16 secciones)</b>	<b>15 (93.8)</b>	<b>12 (75)</b>	<b>4 (25)</b>	<b>12 (75)</b>
Leve	5 (31.3)	6 (37.5)	4 (25)	4 (25)
Moderado	4 (25)	5 (31.2)		1 (6.3)
Severo	6 (37.5)	1 (6.3)		7 (43.7)
<b>Corteza frontal (15 secciones)</b>	<b>15 (100)</b>	<b>9 (60)</b>	<b>6 (40)</b>	<b>10 (66.7)</b>
Leve	6 (40)	5 (33.4)	6 (40)	2 (13.3)
Moderado	3 (20)	2 (13.3)		5 (33.4)
Severo	6 (40)	2 (13.3)		3 (20)

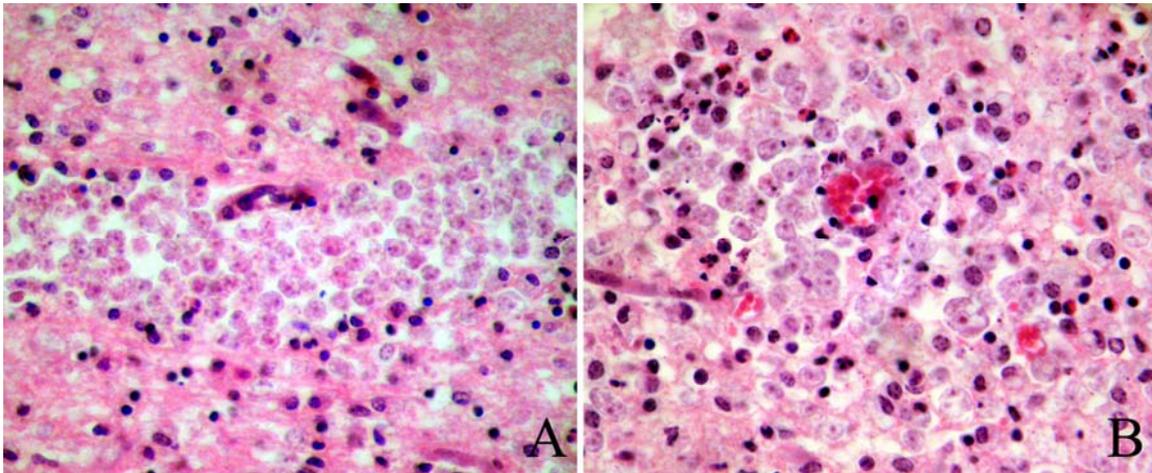
## FIGURAS



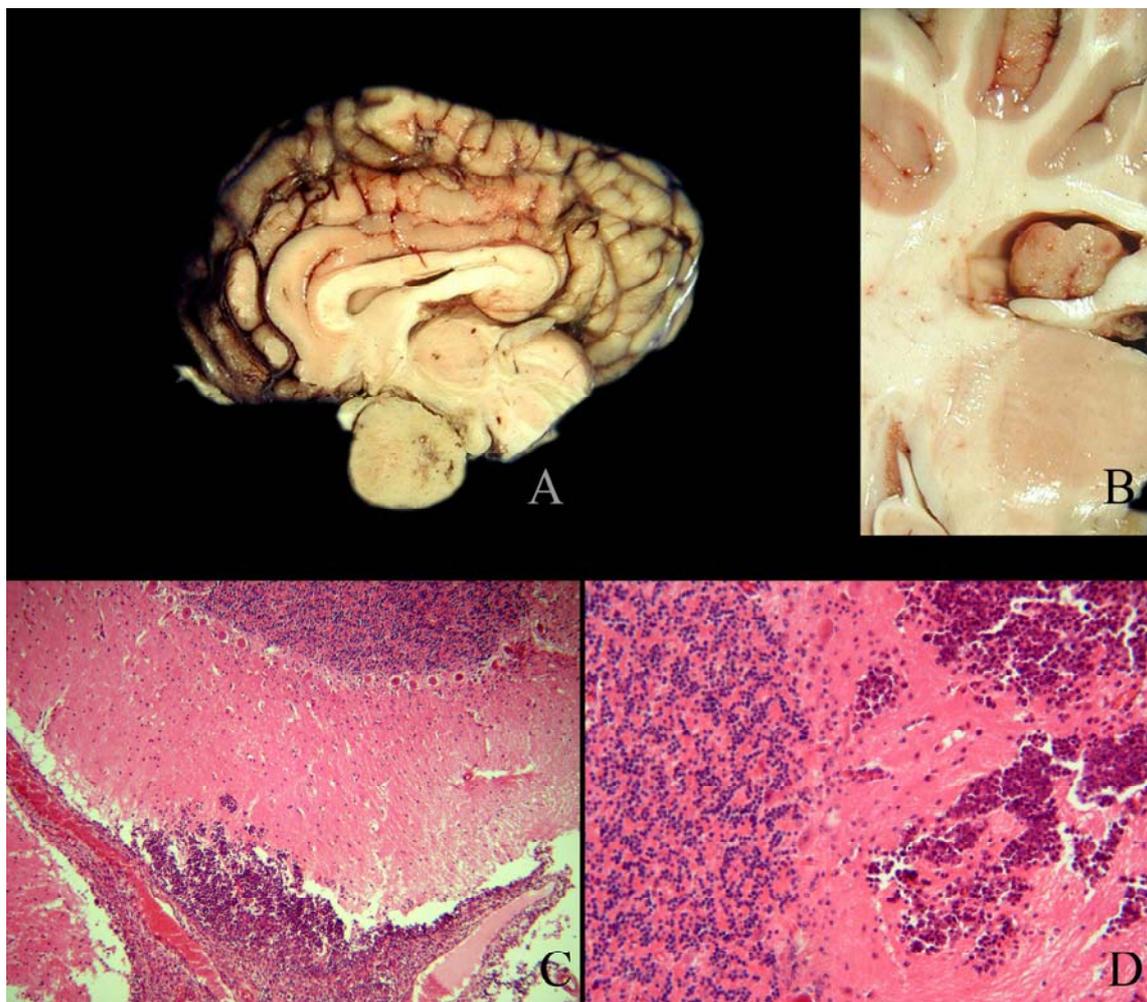
**Figura 1.** Hallazgos histológicos e inmunohistoquímica en el control positivo. Las figuras A y B muestran la vacuolización de las neuronas halladas en el control positivo. Las figuras C y D muestran los patrones de inmunotinción resultado de la IHQ para detectar priones en el tejido. (C) Se puede observar el patrón de deposición en gránulos finos en el pericarion de las neuronas, (D) el patrón difuso-sináptico en el neuropilo y el patrón perivacuolar.



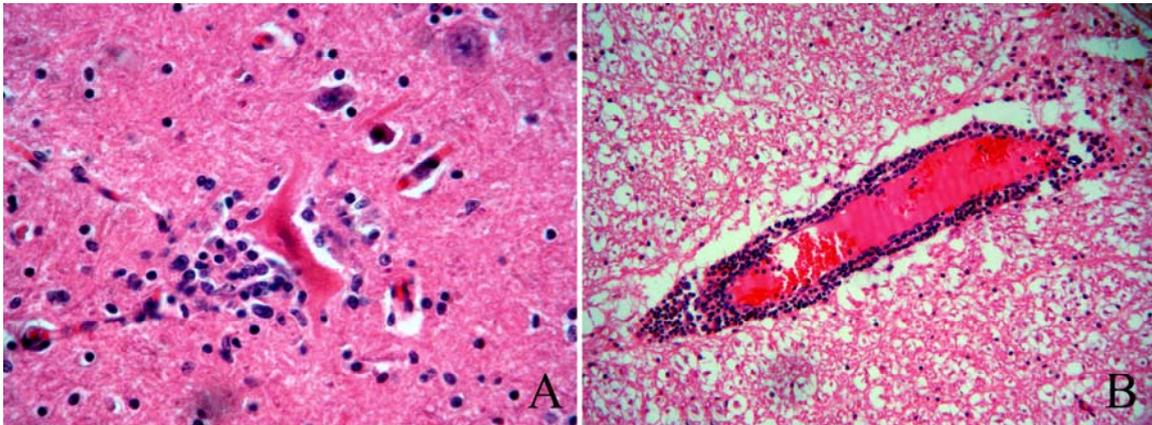
**Figura 2.** Meningo-encefalitis piogranulomatosa. Macroscópicamente se observa un absceso ubicado en el acueducto de Silvio. (B) En la imagen histológica se distingue el absceso como una colección de células inflamatorias y detritos celulares sobre una masiva infiltración inflamatoria mixta (neutrofilos, eosinofilos, células mononucleares y macrófagos) en los espacios de *Virchow-Robins* del romboencéfalo. Las figuras C y D muestran los resultados de prueba de IHQ para la detección de la bacteria *Listeria monocytogenes*. En la figura C se puede advertir la ausencia de inmunotinción en el control negativo y en la D se percibe la fuerte reacción en los macrófagos del caso.



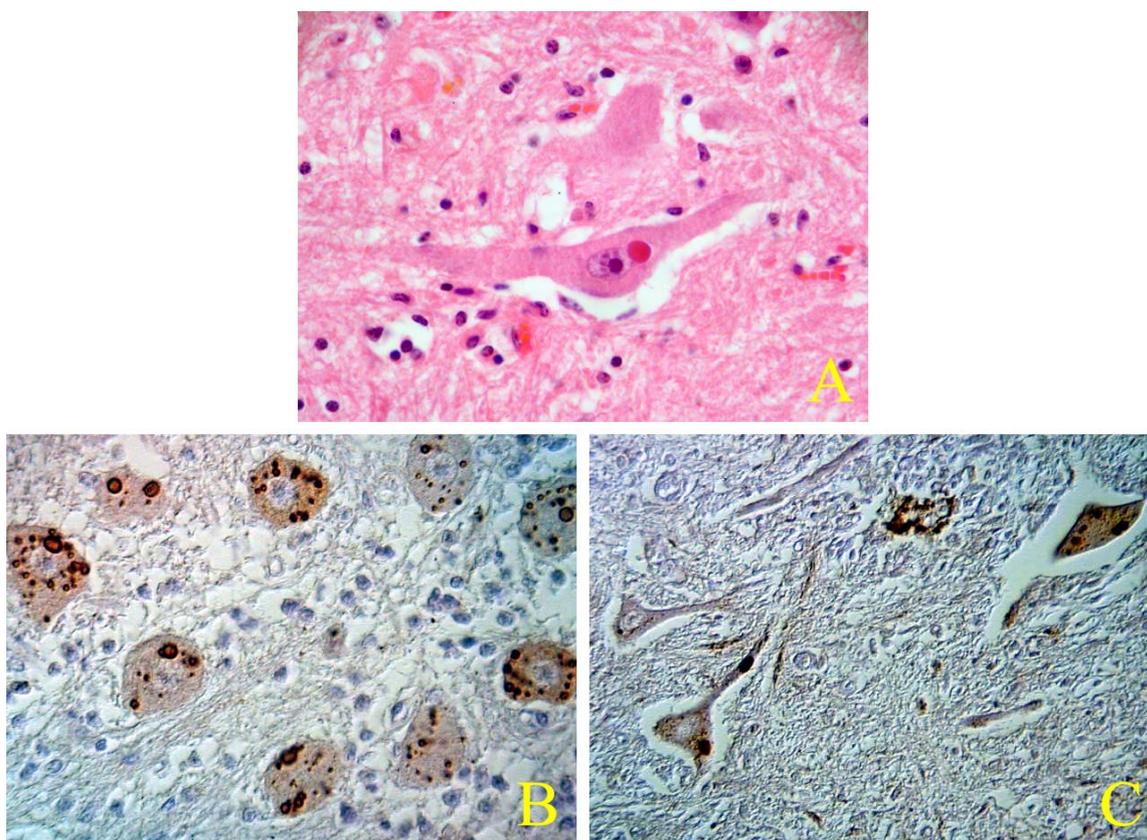
**Figura 3.** (A) Amebas de vida libre, morfológicamente compatibles con *Naegleria fowleri*. (B) Trofozoítos de amebas de vida libre ubicados perivascularmente y que esencialmente se hallaban en el cerebelo, el puente y el tálamo causando inflamación de tipo piogranulomatosa.



**Figura 4.** (A) Sarcoma de las meninges, ubicado en la base del cerebro y (B) en el tercer ventrículo. Imágenes histológicas del tumor mostrando (C y D) la invasión local por células neoplásicas del tejido neural a nivel de la capa molecular del cerebelo.



**Figura 5.** Lesiones halladas en los casos de rabia. (A) Satelitosis y neuronofagia de una neurona a nivel del puente. (B) Infiltrado mononuclear perivascular (en el espacio de Virchow-Robins).



**Figura 6.** Corpúsculos de Negri y resultados de la prueba de inmunohistoquímica con el método de peroxidasa antiperoxidasa para rabia. La figura A muestra un corpúsculo de Negri (inclusiones eosinofílicas intracitoplasmáticas), hallado en un caso positivo en la IF para rabia parálitica bovina. (B, C) Resultado de la técnica de PAP para detección de la rabia en los tejidos, que muestra una fuerte inmunotinción de los sitios de deposición de componentes de la nucleocápside del virus.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Armién, A. G. 2000. Auswertung. pp. 40. *In* Vergleichende klinische und morphologische untersuchungen zur spontanen und experimentellen vergiftung durch *Ipomoeba fistulosa* (Convolvulaceae) bei Ziegen. Jan. 12. These: Doktorgrades beim Fachbereich veterinärmedizin. Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Deutschland.
- Ariza, A. 2002. El patólogo ante las encefalopatías espongiiformes [en línea]. *Revista Española de Patología*. 35: 1-20. Madrid. <http://www/pgmaclie.es/revpatologia/volumen35/volumen35-numf/pdf> (Consulta: 2 feb. 2004).
- Atanasiu, P. 1965. La inmunofluorescencia. pp. 38-68. *In* Curso teórico-práctico sobre laboratorio y epidemiología de la rabia. may. 10-21. Centro Panamericano de Zoonosis. Argentina.
- Barnhart, K. F., J. Wojcieszyn, & R. W. Storts. 2002. Immunohistochemical staining patterns of canine meningiomas and correlation with published immunophenotypes. *Vet. Pathol.* 39: 311-321.
- Bingham, J., & M. Van der Merwe. 2002. Distribution of rabies antigen in infected brain material: determining the reliability of different regions of the brain for the rabies fluorescent antibody test. *J. Virol. Methods.* 101:85-94.
- Boenisch. M. S. T., A. J. Farmilo, R. H. Stead, M. R. Welcher, R. Harvey, & K. N. Atwood. 2002. Manual: métodos inmunohistoquímicos de coloración. 3ra. ed. DAKO Corporation. Calif. U. S.
- Bradford, P. S. 2002. Large animal internal medicine: diseases of horses, cattle, sheep and goats. 3rd. ed. Mosby, Sto Louis. U. S.

- Bradley, R. 1990. Bovine spongiform encephalopathy: the need for knowledge, balance, patience and action. *J. Pathol.* 160: 283-285.
- Braund, K. G. 2003. Neoplasia of the nervous system in clinical neurology in small animals - localization, diagnosis and treatment [en línea]. IVIS (International veterinary information service). N.Y. [www.ivis.org](http://www.ivis.org) (Consulta: 15 ene. 2005).
- Braun, U., N. Pusterla, & E. Schicker. 1998. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic approach and clinical findings. *Compend. Contin. Educ. Proc. Vet.* 20: S270-S278.
- Briggs, D. 1999. Rabies in food animals. pp. 304-306. *In* J. H. Howard, & R. A. Smith. *Current veterinary therapy: food animal practice*. 4th. ed. Saunders, Philadelphia.
- Bundza, A., & K. M. Charlton. 1988. Comparison of spongiform lesions in experimental scrapie and rabies in shunks. *Acta Neuropathol (Berl)*.76: 275-80.
- Burna, N. A., & N. N. Sánchez. 2003. Estudio anatomohistopatológico de rumiantes clínicamente sanos [en línea]. *Rev. Vet.* 15: 5-8. <http://www.unne.edu.ar/cyt/2003/comunicaciones/04-veterinarias/V-20pdf> (Consulta: 20 oct. 2004).
- CDC (Centres for Disease Control and Prevention). 2004. Bovine spongiform encephalopathy in dairy cow-Washington state [en línea]. *M. M. W. R. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 52: 1280-1285. <http://www.cdc.gov/mmwr/previe/mmwrhtml/mm5253a2.htm> (Consulta: 1 oct. 2004).
- Chaplin, M. J, N. Barlow, S. Ryder, M. M. Simmons, Y. Spencer, R. Hughes, & M. J. Stack. 1993. Evaluation of the effects of controlled autolysis on the immunodetection of PrPsc by immunoblotting and immunohistochemistry from cases of scrapie and BSE. *Vet Rec.* 14: 339-341.

- Charlton, K. M. 1984. Rabies: spongiform lesions in the brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 63:198-202.
- Charlton, K. M. 1988. The pathogenesis of rabies. pp 101-150. *In* J. B. Campbell and K. M. Charlton. Rabies. Kluwer Academic, Mass. U. S.
- Cheville, N. F. 1999. Introduction to pathology. pp. 1-3. *In* N. F. Cheville. Introduction to veterinary pathology. 2nd. ed. Iowa State University Press. U. S.
- Chopra, J. S., A. K. Banerjee, J. M. Murthy, & S. R. Pal. 1980. Paralytic rabies: a clinic-pathological study. *Brain*. 103: 789-802.
- Chung, Z. Y. 1999. Rhabdoviridae. pp. 123-144. *In* D. C. Hirsb, & Z. Y. Chung. Veterinary microbiology. Blackwell Science. Mass. US.
- Collins, J. S., V. A. Lawson, & C. L. Masters. 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet*. 363: 51-61.
- Dahme, E., & H. Weiss. 1989. Sistema nervioso. pp. 327-372. *In* E. Dahme. Anatomía patológica especial veterinaria. Acribia. Zaragoza.
- Debeer, S. O., T. G. Baron & A. A. Bencsik. 2002. Transmissible spongiform encephalopathy diagnosis using PrPsc immunohistochemistry on fixed but previously frozen brain samples. *Res. Vet. Sci*. 1: 37-43.
- DSA (Dirección de Salud Animal). Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2003a. Importación de animales vivos y productos de origen animal por Costa Rica. Departamento de Cuarentena Animal. Heredia. C. R.
- DSA (Dirección Salud Animal). Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2003b. Legislación salud animal [en línea]: Decreto ejecutivo N°29285-MAG-S y N°29282-

- MAG. Servicio Fitosanitario del Estado. Ministerio Agricultura y Ganadería. 2003. <http://www.protecnet.go.cr/legislaciónsa/> (Consulta: 20 Ene. 2004).
- DSA (Dirección de Salud Animal). Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). 2005. Resultados de la prueba de inmunofluorescencia (IF) para rabia desde 1985 hasta el 2004. Departamento de Cuarentena Animal. Heredia. C. R.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2004. Encefalopatía espongiforme bovina [en línea]. Departamento de agricultura. Dirección de producción y sanidad animal. [http://www.fao.org/ag/index\\_es.htm](http://www.fao.org/ag/index_es.htm) (Consulta: 20 jun. 2004).
- Fatzer, R., H. U. Graber, R. K. Meyer, C. Cardozo, M. Vandeveldel, & A. Zurbriggen. 1996. Neuronal degeneration in brain stem nuclei in bovine spongiform encephalopathy [en línea]. Zentralbl. Veterinarmed. A. 43:23-29. [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt&list\\_uids=8693830](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt&list_uids=8693830) (Consulta: 20 dic. 2003).
- Fenner, F. J., E. P. J. Gibbs, F. A. Murphy, R. Rott, M. J. Studdert, & D. O. White. 1993. Veterinary virology. 2nd. ed. Academic Press. U. S.
- Foley, G. L., & J. F. Zachary. 1995. Rabies-induced spongiform change and encephalitis in a heifer. Vet. Pathol. 32: 309-311.
- Fuentealba, I. C., S. E. Wikse, W. K. Read, J. F. Edwards, & G. S. Visvesvara. 1992. Amoebic meningoencephalitis in a sheep. JAVMA. 200: 363-365.
- García. M. R. 1993. Laboratorio de anatomía patológica. Fundamentos biológicos de la inmunohistoquímica. pp. 293-34. In R. M. García. (ed.). Laboratorio de anatomía patológica. 1<sup>ra</sup> ed. Mc Graw Hill. Madrid.

- Gibbs, C. J., L. Bolis, D. M. Asher, R. Bradley, R. W. Fite, R. T. Jonhson, B. W. J. Mahy, & G. M. Mckhann. 1992. Recommendations of the international roundtable workshop on bovine spongiform encephalopathy. *JAVMA*. 200: 164-167.
- Gibson, P. H., R. A. Somerville, H. Fraser, J. D. Foster, & R. H. Kimberlin. 1987. Scrapie associated fibrils in the diagnosis of scrapie in sheep. *Vet. Rec.* 120: 125-127.
- González, L., M. Stuart, & J. Martin. 2003. Distinct profiles of PrPr<sup>d</sup> immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J. Gen. Virol.* 84: 1339-1350.
- Gonzalo, P. I., & C. N. Cuadrado. 1998. Conferencias del área de enfermedad por priones [En línea]: Técnicas de inmunohistoquímica en las enfermedades por priones. Escudero, J., M. Gasset, J. de Pedro. Sociedad Valenciana de Neurología. Madrid. <http://svneurologia.org/congreso/priones-10.html> (Consulta: 20 dic. 2003).
- Gutierrez, Y. 2000. Free-living amoebae. pp. 114-142. *In* Y. Gutierrez. Diagnostic pathology of parasitic infections with clinical correlations. 2nd. ed. Oxford University Press. Inc. N.Y. U.S
- Hadlow, W. J. 1999. Reflections on the transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Pathol.* 36: 523-529.
- Hillerton, J. E. 1997. Bovine spongiform encephalopathy: current status and possible impacts. *J. Dairy Sci.* 81: 3042-3048.
- Hoffman, E. O., C. García, J. Lunseth, P. McGarry, & J. Coover. 1978. A case of primary amoebic meningoencephalitis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 29-39.
- Hooper, P. T. 1999. Incidental lesions in the brains of sheep and goats. *Aust. Vet. J.* 77: 398-399.

- Jackson, A. C., Ye H, C. Ridaura-Sanz, & E. C. López. 2001. Quantitative study of the infection in brain neurons in human rabies. *J. Med. Virol.* 65: 614-618.
- Jeffrey, M. 1992. A neuropathological survey of brains submitted under the bovine spongiform encephalopathy orders in Scotland. *Vet. Rec.* 131: 332-337.
- Jiménez, E. 2005. Entrevista con el Dr. Edwin Jiménez. Jefe de Laboratorio de Constatación Biológica y Jefe Sección de Diagnóstico de rabia. Dirección de Salud Animal (DSA). Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). Heredia. C. R. 15 de feb.
- Jones, V., T. C. Martin, P. Keyes, & M, Dawson. 1996. Protein markers in cerebrospinal fluid from BSE affected cattle. *Vet. Rec.* 139: 360-363.
- Jubb, K. V. F., P. C. Kennedy, & N. Palmer. 1993. Pathology of domestic animals. pp. 287-485. *In* Jubb, K. V. F., P. C. Kennedy, & N. Palmer. ed. Pathology of domestic animals. 4th. ed. Vol. 1. Academic Press. Calif. U. S.
- King, A. A., & G. S. Turner. 1993. Rabies: a review. *J. Comp. Pathol.* 108: 1-39.
- Knight, R. 1999. The relationship between new Variant Creutzfeldt-Jakob disease and bovine spongiform encephalopathy. *Vox Sanguinis.* 76: 203-208.
- Koo, H. C., Y. H. Park, B. C. Lee, C. Chae, K. I. O'Rourke, & T. V. Baszler. 2001. Immunohistochemical detection of prion protein (PrP-Sc) and epidemiological study of BSE in Korea. *J. Vet. Sci.* 2: 25-31.
- Lloyd, S. E., J. M. Linehan, M. Desbruslais, S. Joiner, S. Brandner, J. D. Wadsworth, & J. Collinge. 2004. Characterization of two distinct strains derived from bovine spongiform encephalopathy to inbred mice. *J. Gen. Virol.* 85: 2471-2478.

- López, W. J. 2002. Entrevista con el Dr. Jorge López W. Asesor en diagnóstico laboratorial. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. (PANAFTOSA). Heredia. C. R. 19 de abr.
- Martínez, A. J. 1974. Free-living amoebic meningoencephalitis: comparative study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23: 850-5.
- Martínez, B. S. 1999. Vigilancia epidemiológica de la rabia en las Américas [en línea]. Boletín del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. 23: 1-12. <http://www.paho.org/Spanish/HCP/HCV/ZNS/boletín-rabia-2001.htm> (Consulta: 10 jun. 2004).
- McGill, I. S., & G. A. Wells. 1993. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J. Comp. Pathol.* 108:241-60.
- Morales, J. A. 2005. Entrevista con el Dr. Juan Alberto Morales. Patólogo Veterinario Servicio de Patología. Escuela de Medicina Veterinaria. Universidad Nacional (UNA). Heredia. C. R. 8 de feb.
- Murphy, A. F., E. P. Gibbs, M. C. Horzinek, & M. J. Studdert. 1999. Viral central nervous system disease: rabies. pp. 165-166. *In* A. F. Murphy, E. P. Gibbs, M. C. Horzinek, & M. J. Studdert. *Veterinary virology*. 3rd. ed. Harcourt. Calif. U. S.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2003. Encefalopatía espongiforme bovina. pp. 223-238. *In* OIE. Código sanitario para los animales terrestres de la OIE 2003. OIE. Francia.
- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2004a. Official animal health status [en línea]: Bovine spongiform encephalopathy. B. Vallat (ed.). Office International des Épizooties. Francia. <http://oie.int/es> (Consulta: oct-nov. 2004).

- OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal). 2004b. Manual of diagnostics test and vaccines for terrestrial animals (animals, birds and bees). 5th. ed. Vol. 1. OIE. Francia.
- OIRSA (Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria). 2002. Directriz para la vigilancia epidemiológica de encefalopatía espongiforme bovina (EEB). (Nov. 2002). OIRSA. Honduras.
- Palencia, R. 1998. Mesa redonda: encefalopatías humanas por priones. Bol. Pediatr. 38: 250-258.
- Prusiner, S. B. 1998. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 23: 13363-13383.
- Radostitis, O.M., C. C. Gay, D. C. Blood, & K. W. Hinchdiff. 2000. Diseases of nervous system. pp. 501-540. *In* Radostitis, O.M., C. C. Gay, D. C. Blood, & K. W. Hinchdiff. Veterinary medicine: a textbook of diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. 9th. Ed. Saunders Company Ltd. London.
- Spraker, T. R., R. R. Zink, B. A. Cummings, M. A. Wild, M. W. Miller, & K. I. I. O. O'Rourke. 2002. Comparison of histological lesions and immunohistochemical staining of proteinase-resistant prion protein in a naturally occurring spongiform encephalopathy of free-range mule deer (*Odocoileus hemionus*) with those of chronic wasting disease of captive mule deer. Vet. Pathol. 39:110- 119.
- Storts, R. W., & D. L. Montgomery. 2001. The nervous system. pp. 454-544. *In* M. McGavin, W. W, Carlton. & J. F, Zachary. Thomson's special veterinary pathology. 3rd. ed. Mosby. Sto Louis. Mo. U. S.
- Summers, B. A., J. F. Cummings & A. deLahunta. 1995. Veterinary neuropathology. 1st ed. Mosby-year Book. Sto Louis. U. S.

- Taylor, D. M. 1996. Bovine spongiform encephalopathy-the beginning of the end. *Br. Vet. J.* 152: 501-518.
- Valdez, R. A., M. J. Rock, A. K. Anderson, & K. I. O'Rourke. 2003. Immunohistochemical detection and distribution of prion protein in a goat with natural scrapie. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15: 157-162.
- Van der Lugt, J. J., & H. E. Van der Merwe. 1989. Amoebic meningoencephalitis in a sheep. *Microb. Pathog.* 34: 277-285.
- Wells, G. A. H., A. C. Scott, C. T. Johnson, R. F. Gunning, R. D. Hancock, M. Jeffrey, M. Daeson, & R. Bradley. 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121: 419-420.
- Wells, G. A. H., M. Dawson, S. A. C. Hawkins, R. B. Green, I. Dexter, M. E. Francis, M. M. Simmons, A. R. Austin, & M. W. Horigan. 1994. Infectivity in the ileum of cattle challenged orally with bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 135: 40-41.
- Wells, G. A. H., A. R. Sayers, & J. W. Willesmith. 1995. Clinical and epidemiological correlates of the neurohistology of cases of histological unconfirmed, clinically suspect bovine spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 136: 211-216.
- Weissman, C., M. Enari, P. C. Klöhn, D. Rossi, & E. Flechsig. 2002. Transmission of prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 9: 16378-16383.
- WHO (World Health Organization). 2002. Bovine spongiform encephalopathy [en línea]. WHO, France. <http://www.who.int/entity/csr/resourees/publications/bse/en> (Consulta: 5 Nov. 2003).

- WHO (World Health Organization). 2003. WHO manual for surveillance of human transmissible spongiform encephalopathies: including variant Creutzfeldt-Jakob disease, WHO. France.
- Willesmith, J. W., G. A. H. Wells, M. P. Cranwell, & J. B. M. Ryan. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123: 638-644.
- Willesmith, J. W., J. B. M. Ryan, W. D. Hueston, & L. J. Hoinville. 1992. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological features 1985 to 1990. *Vet. Rec.* 130: 90-94.
- Wood, J. L. N., I. S. McGill, S. H. Done, & R. Bradley. 1997. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet. Rec.* 140: 167-174.
- WTO (World trade Organization). 2003. Opinion of the Scientific Steering Committee on the geographical risk of bovine spongiform encephalopathy (GBR) in Costa Rica, adopted by the SSC on 10 april 2003 [en línea]. Scientific Steering Committee. European Communities. Francia. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out333\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/ssc/out333_en.pdf) (Consulta: Ene. 2003).
- Yamakawa, Yoshio., K. H. Hagiwara, K. Nohtomi, Y. Nakamura, M. Nishizima, Y. Higuchi, Y. Sato, T. Sata, & the Expert Committee for BSE Diagnosis, Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. 2003. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrP<sup>res</sup>) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn. J. Infect. Dis.* 56: 221-222.
- Zimmer, K., D. Wiegand, D. Manz, J. W. Frost, M. Reinacher, & K. Frese. 1990. Evaluation of five different methods for routine diagnosis of rabies. *Zentralbl Veterinarmed B.* 37: 392-400.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Origen geográfico de los 108 casos examinados según su procedencia de mataderos, animales con síntomas clínicos y el resultado de la prueba de prueba de inmunofluorescencia para rabia.

Provincia	Nº de animales que presentaron síntomas nerviosos	Nº de casos de matadero	Nº de casos en total	Nº de animales positivos a rabia
Alajuela	47	12	59	23
Cartago	1	10	11	0
Guanacaste	6	0	6	0
Heredia	4	0	4	1
Limón	6	0	6	1
Puntarenas	7	13	20	1
San José	2	0	2	0
Totales	73	35	108	26

### Anexo 2. Distribución de la población evaluada (108 bovinos) y de los animales con síntomas nerviosos según la edad.

Edad	Nº (%)	Nº (%)
Joven (<30 meses)	30 (27.6)	30 (41.1)
Adulta ( $\geq$ 30 meses)	74 (68.5)	39 (53.4)
No definido	4 (3.7)	4 (5.5)
Total	108 (100)	73 (100)

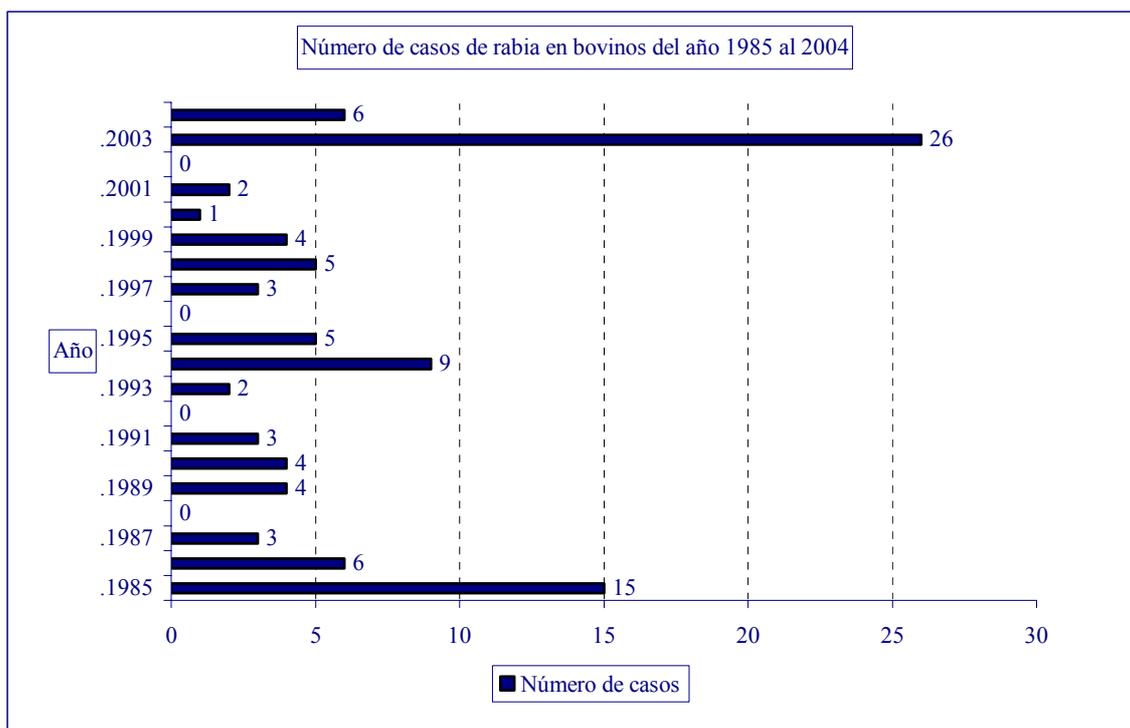
**Anexo 3. Distribución de la población evaluada (108 bovinos) y de los animales con síntomas nerviosos (73 bovinos) según el sexo.**

Sexo	Hembra	Macho	No definido	Total
Nº de animales examinados en total (%)	87 (80.6)	17 (15.7)	4 (3.7)	108 (100)
Nº de casos de animales con síntomas nerviosos (%)	54 (74)	15(20.5)	4 (5.5)	73 (100)

**Anexo 4. Distribución de la población evaluada (108 bovinos) y de los animales con síntomas nerviosos (73 bovinos) según la raza.**

Raza	Nº de casos	Nº de casos de animales con síntomas nerviosos
Cebú	12	9
Indu Brazil	1	1
Holstein	12	1
Brahman	23	20
Jersey	5	2
Guernsey	2	2
Pardo Suizo	1	1
Nelore	1	0
Simmental	4	4
Sin raza definida “criolla”	26	26
Sin anamnesis.	21	7
Total	108	73

**Anexo 5. Número de casos de rabia en bovinos diagnosticados con la técnica de inmunofluorescencia desde el año 1985 al 2004.\***



\* Información suministrada por la Dirección de Salud Animal, MAG, 2005.