

TOMO LIX

**ACADEMIA NACIONAL  
DE AGRONOMIA Y VETERINARIA**

ISSN 0327-8093

BUENOS AIRES

REPUBLICA ARGENTINA

---

# **Veinte años después de la aparición de la BSE**

## **Discusiones actuales, incógnitas y relación con otras TSE**

### **Académico de Número Dr. M.V. Emilio J. Gimeno**



Sesión Pública Extraordinaria  
del  
8 de Septiembre de 2005

# **TEMARIO**

## **INTRODUCCIÓN**

### **CAPITULO I: LOS AVANCES EN LAS MEDIDAS DE CONTROL**

- 1.1. BASES NORMATIVAS DE LA BSE
- 1.2. DIRECTIVAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE PAISES
- 1.3. SUSTANCIAS CATEGORIZADAS EN LA TRANSMISIÓN DE BSE
- 1.4. PROGRAMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
- 1.5 PAISES DECLARADOS PROVISORIAMENTE LIBRES.
- 1.5.1. LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA EN LA ARGENTINA
- 1.6. INVASIVIDAD INTERESPECIES
- 1.7 PROCEDIMIENTOS PARA LA INACTIVACIÓN DEL AGENTE
- 1.8. METODOS DE DIAGNOSTICO RECONOCIDOS Y EN INVESTIGACIÓN
- 1.8.1. PRUEBAS HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUIMICAS
- 1.8.2. PUEBAS POR ELECTROFORESIS
- 1.8..3 PRUEBAS RAPIDAS.

### **CAPITULO II. INFORMACIONES DE INTERES EPIDEMIOLÓGICO**

- 2.1. TABLAS DE INFORMACIÓN EPIDEMIOLÓGICA
- 2.1.1 LOS CASOS DEL REINO UNIDO (RU)
- 2.1.2. LOS CASOS EN EL MUNDO
- 2.1.3. PAISES CON CASOS IMPORTADOS
- 2.1.4 TASAS DE INCIDENCIA POR PAISES
- 2.2. DISCUSIÓN DE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS
- 2.2.1 OBERVACIONES SOBRE LA EPIDEMIA DE BSE EN RU
- 2.2.2.. OBSERVACIONES SOBRE INCIDENCIA EN OTROS PAISES
- 2.2.3. OBSERVACIONES SOBRE PREVALENCIAS POR ESTABLECIMIENTOS DEL RU

### **CAPITULO III. INFORMACIONES SOBRE PATOGENIA E INFECCIÓN**

- 3.1. ETIOLOGÍA DE LA BSE Y ESTRUCTURA DEL PRION
- 3.2. PATOGENIA DE LAS TSE
- 3.2.1. FUNCIONES DE LOS PRIONES
- 3.2.2 PROPAGACIÓN DE PRIONES
- 3.3. LA TRANSMISIBILIDAD DE LAS TSE
- 3.3.1.. DOSIS INFECTANTE.
- 3..3.2. UNICA CEPA DE BSE
- 3. 3.3. INFLUENCIAS DEL GENOTIPO DEL HUÉSPED EN TSE
- 3.3.4. TRANSMISIÓN MATERNA DE BSE
- 3.3.5. TRANSMISIÓN HORIZONTAL Y AMBIENTAL EN TSE
- 3.3.6. LA BSE Y LA BARRERA DE LAS ESPECIES

## **CAPITULO IV - LA VARIANTE DE CJD Y LA BSE**

## **CAPITULO V- LOS FACTORES ECONOMICOS RELACIONADOS CON LA BSE**

5.1 PÉRDIDAS POR DETERIORO ANIMAL Y COSTOS DE CONTROL

5.2.PÉRDIDAS POR PROHIBICIONES DE LA HCH

5.3.PÉRDIDAS POR CIERRE DE MERCADOS

## **CONCLUSIONES**

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Agradecimientos: Por sus ajustadas orientaciones y correcciones, agradecemos a los Dres. Bernardo J. Carrillo, Eduardo L. Palma, Alejandro Schudel y Laura Weber.

# **VEINTE AÑOS DESPUES DE LA APARICIÓN DE LA BSE**

## **Discusiones actuales, incógnitas y relación con otras TSE**

(\*)

(\*\*) **Académico de Número Dr. M.V. Emilio J. Gimeno**

### **INTRODUCCION**

Si bien la Encefalopatía Espongiforme Bovina ( BSE en ingles) fue diagnosticada como enfermedad nerviosa degenerativa del bovino en el Reino Unido ( RU) en Noviembre de 1986 (1), más de un año antes en una granja de West Sussex, se detectó un caso anormal en una vaca lechera, que se consideró como una "intoxicación de origen extraño". Pocos meses después los casos fueron cientos, y para el 2002 se habían superado los 180.000 bovinos muertos con diagnóstico de BSE, solamente en el RU.

Hoy 20 años después, conocemos bastante de la extraña etiología de la BSE (·), entendemos su epidemiología, incluyendo su capacidad de invasión "interespecies", hemos avanzado en las medidas de prevención y control. Sin embargo, como en todas las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (TSE en ingles), quedan todavía, muchas dudas sobre su patogenia y en especial sobre su etiología y la vinculación genética. Se reconoce como agente, a las proteínas priónicas del sistema nervioso. Conocemos sobre su estructura, pero no así las causas, por las que esta proteína priónica, se convierte de conformaciones normales (PrPc) en anormales (PrPres o PrPsc o PrPbse). Se produce ello mediante modificación de los pliegues y segmentos, de las proteínas Priónicas normales, que se transforman en las formas anormales conocidas como isomórficas, y que luego replican siendo causales de la enfermedad Pero sigue siendo una incógnita las causas de esta transformación.. No se ha reconocido material nucleico para su multiplicación, pero se observa que en las TSE en general, hay caracteres de aspectos genéticos co-adyuvantes del huésped, que influirían en la susceptibilidad o en la capacidad de resistencia de las especies.

A pesar de estas incógnitas, se ha logrado en el RU y en varios países de Europa bajar el nivel anual de incidencia, desde mediados de los 90', mejorar los sistemas de diagnostico, demostrando que las medidas de control aplicadas tienen alto grado de eficacia, confirmando su respaldo científico-experimental.

Sin embargo, el conocimiento científico no satisface las dudas del consumidor, que se expresan en el comercio internacional con estrictas medidas de cierre de mercados, ante la mas minina sospecha de la enfermedad. Es

Nota: Por razones bibliográficas, se utilizan las siglas en ingles, para indicar la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB=BSE), las Encefalopatías , Espongiformes Transmisibles (EET=TSE) y Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

(\*)Un resumen de este trabajo fue presentado en Reunión Privada de la Academia del 14 de Julio de 2005.

(\*\*) Presidente Honorario de OIE.

remarcable el cierre comercial internacional a EEUU en el 2004, ante un sólo caso detectado de BSE, en un animal, importado desde Canadá, cuya repercusión representó miles de millones de dólares de pérdida, para quien hasta hace pocos años, ocupara uno de los primeros lugares como país, exportador de carne bovina.

La relación de la BSE con la patología humana, es uno de los hechos médicos más relevantes en la última década, a raíz de la sospecha desde 1996, de su posible transmisión por materiales de origen bovino. Ello ha llevado a la BSE a convertirse en la zoonosis más temida y estudiada de los últimos tiempos. El desarrollo de técnicas de diagnóstico basadas en Western Blot y el análisis estadístico de los resultados por inoculación en ratones transgénicos genéticamente modificados, confirmarían la asociación de cepas de la BSE con la vCJD(-). Esto nos obliga a conocer, como parte importante desde el punto de vista del control, las relaciones entre BSE y las formas espongiiformes en otras especies, atendiendo las características de la proteína causal y las caracterizaciones genéticas que aparecen vinculantes.

El motivo de este trabajo, es seleccionar en forma resumida, la múltiple información, hoy disponible que llega de distintas partes del mundo sobre las TSE, y destacar los aspectos que creemos más importantes, para facilitar la real comprensión de esta patología, en los ámbitos profesionales interesados. Dada la situación privilegiada ante las enfermedades espongiiformes, que puede mostrar la Argentina, gracias a un trabajo consistente realizado durante años, nuestra intención es difundir información valiosa y resaltar los avances concretos que se van produciendo, para facilitar la comprensión de un tema tan complejo como las TSE.

En la Sesión General No 73 del Comité Internacional de la OIE, realizada en Mayo de 2005 en Paris, se aprobaron normas y directivas, que cambian bastante los criterios hasta ahora sustentados para controlar la BSE, en función de los sistemas de vigilancia, la caracterización de los Materiales de Riesgo (SMR) para la transmisión y la aplicación de la metodología del Análisis de Riesgo (AR). De estos factores, surgen finalmente los criterios para establecer la categorización de los países. Como la Argentina, es uno de los pocos países, hasta ahora reconocidos como "prácticamente" libre de BSE, estas modificaciones, van a tener repercusiones técnicas y económicas que seguramente traerán en el futuro importantes discusiones en ámbitos técnicos y comerciales, oficiales y privados.

Por todas estas razones, entendemos que tanto en sectores técnicos y profesionales, como en los vinculados a actividades agroindustriales relacionadas, es importante estar actualizados y atentos, sobre los adelantos en el conocimiento de estos trastornos y las normas internacionales aplicadas. De ello va a depender la prevención y el control de las TSE, en particular la BSE, lo que equivale a decir, el comercio mundial de animales y carnes. El poner en claro hechos reales y diferenciarlos de las noticias oportunistas, creemos que es una contribución para el esclarecimiento de tan compleja patología y ayudar a la mejor comprensión, de las medidas prácticas de control derivadas.

Difundir los complejos aspectos técnicos de estos temas, actualizarlos y hacerlos accesibles a los interesados, es el motivo de esta publicación.

# CAPITULO I

## PROGRESOS EN LA EFICACIA DE LAS MEDIDAS DE CONTROL

### 1. BASES NORMATIVAS

Principios técnicos establecidos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Los Datos han sido seleccionados y extraídos del Código Sanitario para los Animales Terrestres Ed. 2004 y modificaciones del 2005- Parte II, Capítulo 2.3.13 sobre BSE y Apendices 3.8.4. sobre vigilancia de BSE , 3.8.5 sobre Evaluación de Riesgo de BSE y 3.6.3. sobre inactivación del agente de la BSE.

De acuerdo a observaciones prácticas e investigaciones experimentales, quedó demostrada para mediados de 1988 en el Reino Unido (RU), la importancia de la Harina de Carne y Hueso (HCH) en la transmisión de la BSE, como factor clave de difusión y transmisión de la enfermedad. Los controles aplicados a la fabricación y las prohibiciones de su uso para la alimentación de rumiantes, resultaron la base de los sistemas de prevención y además particularmente definitorios en la evaluación de los **Análisis de Riesgo (AR)** necesarios, que debe hacer cada país, para establecer el "estatus sanitario" que le corresponde referente a la BSE.

1.1. El Código zoosanitario de OIE, establece las condiciones a observar para controlar el agente causal ( considerando como tal, básicamente a la proteína príon patógena (PrPres o PrPsc ). Se destacan varios aspectos para el control y prevención de la BSE, aunque el más relevante es el relacionado a la transmisión por las HCH, como vehículo para el reciclaje y amplificación de la enfermedad. Las condiciones que deben ser observadas, para la definición de la situación sanitaria de un país, respecto a la de BSE, se basan en los siguientes aspectos, considerando las últimas modificaciones, adoptadas en Mayo de 2005.

#### **a. Evaluación de la difusión: ( Release assessment)**

Presencia o ausencia de otras TSE animales en el país. Importación de HCH (Harina de carne y hueso) y de animales bajo riesgo de zonas o países contaminados. Importación de productos de origen rumiante catalogados de riesgo (Ver sección de SRM, ).

#### **b. Evaluación a la exposición (Exposure assessment)**

Controles del potencial reciclado y ampliación del agente de la BSE a través del consumo bovino de HCH de origen rumiante. Prohibición del uso de las carcasas de rumiantes en frigoríficos, para producir HCH o alimentos para rumiantes. Previsiones para evitar el riesgo de producir contaminaciones cruzadas en el uso de la HCH.

Mantener un sistema oficializado, de alerta e información a veterinarios, productores e industriales vinculados a la ganadera bovina y su industria.

Tener reglamentado un sistema compulsivo de notificación.

Tener establecida una capacidad de diagnóstico con la instalación de laboratorios, para poder efectuar un sistema de monitoreo y vigilancia, permanente.

Demostrada la implicancia de la HCH, el RU prohibió las HCH desde Julio de 1988, mientras la Unión Europea (EU) aplicó la prohibición desde 1994. Para prevenir la producción de contaminaciones cruzadas, luego en 1996 en el RU se extendió la prohibición a todos los animales de granja, incluyendo caballos y peces, lo que realizó también la UE, pero recién en el año 2001. Ello se hizo ante la observación de la existencia de contaminaciones cruzadas y usos no adecuados de la HCH en su comercio internacional, que provocaron la difusión de la BSE a diversos países. (Ver Capítulo II; Aspectos Epidemiológicos)

En la Argentina, desde 1995 rige la prohibición del uso de harinas de rumiantes para alimentación de rumiantes, como medida de precaución.

## 1.2. DIRECTIVAS PARA LA CLASIFICACIÓN DE PAISES

Sobre la base de estos criterios y como resultado de la **vigilancia y monitoreo**, surge de las actuales directivas, el nivel de clasificación de países respecto a la existencia de la BSE., basados en el **Análisis de Riesgo**.

### a. Países de Riesgo Insignificante ( Negligible Risk)

Son aquellos países donde **no se registran casos** de animales autóctonos con BSE, o **se registraron eventuales casos importados que fueron sacrificados**, cumpliendo las normas sanitarias. Llevan una identificación histórica de los factores de riesgo, y **han demostrado un apropiado sistema de medidas**, controlando los factores que determinan el riesgo de la enfermedad, que básicamente se mencionan en el punto 1.1. Estos países deben poder demostrar que esas medidas, se cumplen por lo menos desde los últimos **siete años**, y además respecto a **la prohibición de HCH** de rumiantes para destino de la alimentación en rumiantes, se controla y audita por lo menos desde hace **ocho años**.

Dichos países, también llevan a cabo una vigilancia epidemiológica de acuerdo con el tipo B, indicada por OIE, que garantiza, con una seguridad del 95%, la posibilidad de detección de la BSE, por lo menos de 1 caso en 50.000 bovinos. (Ver sección PROGRAMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA).

### b. Países de Riesgo controlable (Controlled Risk)

Son aquellos países que habiendo **presentado casos autóctonos** de BSE, o los **eventuales casos importados**, fueron sacrificados, cumpliendo las normas sanitarias, que se recomiendan para controlar los factores de riesgo. Entran en esta clasificación, también los países que en la identificación histórica de los factores de riesgo, **no han podido demostrar, que desde hace por lo menos 7 años, se cumple un apropiado sistema de medidas**, controlando los factores

que determinan el riesgo de la enfermedad. Tampoco **pueden demostrar que las medidas de control**, de la prohibición de consumo de HCH de rumiantes, en la alimentación de rumiantes, se cumple desde por lo menos, hace **ocho años**.

Dichos países, también deben llevar a cabo una vigilancia epidemiológica de acuerdo con el tipo A, indicada por OIE, que garantiza con una seguridad del 95%, la posibilidad de detección de la BSE, por lo menos de 1 caso en 100.000 bovinos. (Ver sección PROGRAMA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA).

### **c. Países de Riesgo Indeterminado ( Undetermined Risk)**

Son los países que no pueden demostrar los sistemas de control y de Análisis de Riesgo para satisfacer condiciones de seguridad de las dos categorías anteriores y por lo tanto carecen de garantías.

Debemos hacer notar el cambio de clasificación de países, que aplicaba OIE hasta mayo de 2005. Ellos eran, **países o zonas Libres, Provisoriamente Libres, de Riesgo mínimo, de Riesgo moderado y de Alto Riesgo**, según la aplicación de medidas en el tiempo y la ocurrencia de la enfermedad. La actual clasificación es más sencilla, pero menos diferenciada entre países infectados y libres, además de exigir un sistema de monitoreo de base estadística de altísimo costo.

## **1.3. SUSTANCIAS CATEGORIZADAS en la transmisión de BSE**

Es importante para definir y estimar los **Análisis de Riesgo**, el clasificar las sustancias que involucran riesgo y cuales se definen como no peligrosas para la transmisión de la BSE. Ello es trascendente para el control de la enfermedad y para las operaciones comerciales, en el intercambio internacional de alimentos y productos animales.

**1.3.1. Sustancias consideradas como materiales de riesgo específico (SMR).** Se incluye como SRM ; órganos como cerebro, medula espinal, ganglios nerviosos espinales, ganglio trigémino, ileum distal, médula ósea. Tonsilas.

**1.3.2..No se consideran de peligro, y por lo tanto autorizables para la importación, sin requerimiento de condiciones referente a la BSE, los siguientes productos animales.**

Leche y productos lácteos,

Semen, embriones "in vivo" derivada de su recolección acorde a las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Transferencia Embrionaria.

Cueros y pieles,

Gelatina y colágeno de origen de cuero,

Sebo desproteínado,

Fosfato bi-cálcico ( sin proteína o grasa) .

Músculos deshuesados provenientes de vacunos de menos de 30 meses de edad, siempre que no hayan sido sacrificados con métodos que originen, contaminación con tejidos de riesgo de origen nervioso.

Sangre y subproductos de la sangre, siempre que provengan de animales bovinos, no faenados con métodos que comprimen aire o gas en la cavidad craneana.

#### **1.4. PROGRAMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA**

Los países deben demostrar que se cumple un programa de Vigilancia Epidemiológica activa y pasiva, y monitoreo acorde con los sistemas de muestro y técnicas de diagnóstico, establecidos por OIE, de acuerdo a los parámetros fijados por la directiva del apéndice 3.8.4. del Código de OIE. (Argentina cumple con esto?)

El programa de vigilancia, está determinado por las capacidades de monitoreo sobre animales y por la cantidad de análisis diagnóstico que los laboratorios especializados, pueden realizar. Esto, de acuerdo a las nuevas directivas de OIE, va a exigir un extraordinario nivel de gastos, a los países para demostrar su situación epidemiológica. Ello está justificado en países infectados, que deben demostrar su nivel de control, pero no se justifica en algunos países como la Argentina, que ya había demostrado exhaustivamente su indemnidad, con un eficiente trabajo de años (Ver Sección países Provisoriamente Libres).

El sistema actual de vigilancia, se base en dos aspectos principales. Unos es la clasificación de animales a monitorear y el otro los sistemas de muestreo, en base a la estrategia del país para fijar su carácter de riesgo, como insignificante o controlado.

##### **1.4.1. Clasificación de animales. Se determinan cuatro clases de poblaciones**

1. Bovinos de más de 30 meses de edad, que manifiestan comportamientos y signos clínicos compatibles con la Encefalopatía Espongiforme (Sospecha clínica)
2. Bovinos de más de 30 meses de edad, que no caminan, están acostados y son incapaces de levantarse (Ganado caído)
3. Bovinos de más de 30 meses de edad hallados muertos en la explotación, en el transporte o matadero (Sacrificio de emergencia)
4. Bovinos de más de 36 meses de edad, destinados a la faena de rutina (Sacrificio de rutina).

A cada una de estas categorías, se le ha adjudicado un valor relativo, que se aplica en una escala, para estimar valores en la evaluación, que debe hacerse a la población general, para demostrar dentro de parámetros estadísticos, la no existencia de la enfermedad. Todos los países, señala de directiva 3.8.4, deberán muestrear al menos tres de las cuatro categorías, para lograr el puntaje computable.

### **1.4.2. Puntaje Computable.**

Los países deberán definir las categorías a los que se adhieren. Pueden ser los de Categoría A o sea aquellos que están en un programa de Enfermedad con Riesgo Controlado. Deberán demostrar que su nivel de detección de la enfermedad permite captar una prevalencia, de al menos 1 caso por 100.000 animales, con un nivel de confianza de 95% .

Los países que demuestran estar por sus programas en una Categoría B o de Riesgo Insignificante, podrán demostrar que no presentan un nivel de enfermedad, mediante el muestreo, que garantice estadísticamente, que los niveles de prevalencia no superan el de 1 caso cada 50.000 animales, con un nivel de confianza del 95%.

Para poder demostrar estos niveles epidemiológicos, se deberá aplicar la tabla adjunta que se indica como I, en la Directiva 3.8.4.del Código zoonosanitario de GIE, mediante la cual se establecen los puntos que deben lograr los países, para definirse con las prevalencias máximas 1/100.000 y 1/50.000.

También se adjunta la tabla indicada como II en la misma directiva , por la cual se establecen los valores que corresponden sumar, por cada animal de las respectivas cuatro categorías determinadas, para llegar a los puntajes indicados.

**PUNTOS POR PAIS PARA DETERMINAR 0 (Cero) CASO CON 95% DE CONFIANZA, SOBRE LA POBLACIÓN BOVINA.**

**TABLA I de la Directiva en Apéndice 3.8.4.**

BOVINOS ADULTOS DE 24 MESES EDAD O MAS	DP(Puntos de valor) para 1/100.000 de prevalencia	DP(Puntos de valor) para 1/50.000 de prevalencia
>0= 1.000.000	300.000	150.000
800.000 - 1.000.000	240.000	120.000
600.000 - 800.000	180.000	90.000
400.000 - 600.000	120.000	60.000
200.000 - 400.000	60.000	30.000
100.000 - 200.000	30.000	15.000
50.000 - 100.000	15.000	7.500

VIGILANCIA POR SUB POBLACIÓN. Valores de Puntos de las muestras tomadas de animales en la subpoblación y categoría de edades, determinadas en la vigilancia

**TABLA II de la Directiva en Apéndice 3.8.4**

Matanza de Rutina - Ganado caído - Sacrificio emergencia - Sospecha clínica			
	EDAD > 1 AÑO Y < 2 AÑOS		
0,1	0,2	0,4	N/A
	EDAD > 2 AÑOS Y < 4 AÑOS		
0,1	0,2	0,4	260
	EDAD > 4 AÑOS Y < 7 AÑOS		
0,2	0,9	1,6	750
	EDAD > 7 AÑOS Y < 9 AÑOS		
0,1	0,4	0,7	220
	EDAD < DE 9 AÑOS		
0.0	0,1	0,2	45

Los puntos son válidos durante 7 años.

Ejemplo: La Argentina, debería fija una prevalencia de 1/50000, para lo cual debería completar 150.000 puntos, (TABLA I), devengados por la suma de por ejemplo, 0,01 por animal faenado menor de 2 años, ó 0,2 faenado entre 4 y 7 años, o 0,9 por cada "caído o acostado" o por los puntos de las diversas categorías.(TABLA II). Desde ya que el puntaje, surge de la suma de los valores de las categorías de los animales que se controlen, y que deben resultar negativos, utilizando las pruebas diagnósticas correspondientes. (Ver Capítulo Diagnóstico). Para hacer el muestreo propuesto, por su gran número, debería aplicarse en base a las pruebas rápidas, cuyo costo para varios de cientos de miles de animales necesarios para llegar al puntaje, representarán una suma muy importante, de difícil financiación.

Es más razonable para la Argentina, mantener el criterio anterior de OIE, respecto a la vigilancia y control de animales con sintomatología nerviosa. Ello permitía una observación más certera, que la simple acumulación de pruebas en animales sin significación epidemiológica, que son valorados en su gran mayoría, en la encuesta actual entre 0,01 punto y 0,2 punto. Puntajes mayores, para "animales caídos y con sintomatología", no existen en un país sin enfermedad.

Este es un asunto que deberá ser discutido en base a razonamientos técnicos y demostraciones de orden práctico, por los países libres de la enfermedad, que hoy quedan prácticamente igualados a los que presentan la enfermedad. Lo que en definitiva se está exigiendo es un muy estricto sistema de control, que permita detectar con alta seguridad, la presencia de un caso, a pesar de la baja prevalencia, que presenta en general la BSE. Sin embargo no resulta practico, ni justo aplicar el mismo criterio de muestreo, cuando un país puede demostrar por historia epidemiológica y régimen de producción, el no tener la enfermedad, luego de años de aplicar medidas restrictivas y de monitoreo práctico, con todo éxito.

Ello obliga, para dar mayor claridad al problema, a que en este trabajo se demuestren y comparen, las diferencias con respecto a los sistemas anteriores, que funcionaron con eficiencia, durante años.

#### **1.4.3. DIRECTIVAS PARA la VIGILANCIA DE LA BSE, SEGÚN OIE HASTA EL 2004**

Se señala el número mínimo de exámenes en bovinos de más de 30 meses, con sintomatología nerviosa, que debían monitorearse en una zona o país.

Se reconoce, dada la baja tasa de prevalencia de la BSE, que la práctica de muestreos de base estadística de los animales bajo riesgo, representan muestras que además de relativa significación, tienen un altísimo costo. Por lo tanto se había optado por practicar muestras sesgadas, sobre animales que presenten alguna sintomatología nerviosa, seleccionando como población de riesgo, aquellos bovinos con más de 30 meses de edad, como segmento para confirmar o descartar la enfermedad. El número de exámenes de bovinos con síntomas clínicos nerviosos, fue convenido sobre la base de la población de la zona o país, a animales mas de 30 meses de edad y se detallan en la Tabla III.

Población	Muestra	Población	Muestra
500.000	50	7.000.000	336
700.000	69	10.000.000	367
1.000.000	99	20.000.000	409
2.500.000	195	30.000.000	425
5.000.000	300	40.000.000	433

**Tabla III**

Estas muestras, se debían obtener de animales con el mayor riesgo potencial por edad, utilidad y manejo. Se debían tomar en todo el país, ya sea en mataderos o establecimientos, en un sistema de alerta, controlado por los Servicios Oficiales del país.

## 1.5. PAÍSES DECLARADOS PROVISORIAMENTE LIBRES DE BSE POR OIE

De acuerdo con el cumplimiento de los principios normativos de Análisis de Riesgo, hasta mayo de 2004, solamente cuatro países, fueron reconocidos como Provisionalmente Libres. Ellos son ARGENTINA, ISLANDIA, SINGAPUR, y URUGUAY, atendiendo las condiciones impuestas desde el punto de vista epidemiológico, monitoreos, importación y manejo de materias de riesgo (SRM).

### 1.5.1. Posición de la Argentina.

Merece destacarse que además de sus condiciones naturales favorables para el control de la BSE, la Argentina ha llevado desde hace años, una actividad permanente de vigilancia y de monitoreo, que ha merecido el reconocimiento mundial. Se acompaña Tabla 4 con distribución de muestras obtenidas por especie hasta Febrero de 2004, sobre las que se hicieron estudios diagnóstico y de descarte de las TSE, mediante monitoreos y programas de vigilancia activa.

**TABLA IV. Distribución de muestras en Argentina según especies**

Categoría	Bovinos	Ovinos	Caprinos	Llamas	Ciervos	Visones	Felinos	Total
Recibidas	13.090	4559	494	21	98	64	52	18.382
Animales	839	1330	243	5	2	--	5	2424
Disminuidos								
Casos clínicos	1267	36	21	--	--	--	47	1371
Emergencia	1315	3						1318
y caídos								
Muertos	362	4	1	8				375

Tabla 4. - Datos de SENASA, INTA; SAGYA. Comprende los estudios realizados desde 1989. Presentados por FJ. Blanco Viera, EL. Weber y BJ. Carrillo en la Publicación editada por la Bolsa de Cereales. Junio 2004

## 1.6. LA INVASIVIDAD INTERESPECIE EN LOS MONITOREOS

Un aspecto importante, en la caracterización de la BSE en un país, son las particularidades de invasividad interespecie, que exige el control simultáneo de las formas espongiiformes en ovinos y caprinos, con Prurigo Lumbar (Scrapie). Considerando su relación con el "rendering" en la elaboración de HCH, la historia del origen de la BSE, surge por la posible adaptación del agente del Scrapie al bovino, bajo la forma de BSE.

Además por evidencia experimental, se ha logrado en los ovinos el contagio con el agente del bovino (2)(3) y recientemente en Francia se han detectado casos de BSE en cabras (Oliver, et al, 2004) También es demostrativa la aparición de TSE en gatos y otros felinos en cautiverio( 4)(5) por contagio alimentario. Otro hecho sospechoso es la aparición en visones alimentados con carne bovina en EEUU desde 1947, con focos en 1961, 1963,1985, (6) (7) (8) y con aparición repetida también en Finlandia, (9) Alemania (10)y Rusia (11) También debe atenderse la sorprendente existencia de encefalopatías espongiiformes en ciervos salvajes atacados por la Chronic Wasting Disease (CWD.) Esta forma espongiiforme, ocurre en los cérvidos en cautiverio y en convivencia natural y se presenta en EEUU y Canadá desde 1967. Su epidemiología presenta curiosos interrogantes sobre vías de contagio de las TSE, que no han podido ser aún definidas. (12).

## 1.7. PROCEDIMIENTOS PARA LA REDUCCIÓN DE LA INFECTIVIDAD DEL AGENTE DE LA BSE

Corresponde hacer resaltar la alta resistencia del agente, expresando por las Proteínas PrPre, que soportan la destrucción por los antisépticos, enzimas proteolíticas y esterilizaciones convencionales. Deben ser consideradas la aplicación de las medidas de inactivación, como factores de control, cuyas bases se establecen en el apéndice 3.6.3. del Código zoonosario de OIE La destrucción de material contaminante se logra, si el tejido contaminado, esta desmenuzado en partículas de 50 mm, y debe soportar temperaturas superiores a 133 C, durante unos 20 minutos, con una presión saturada de vapor a 3 bares.

## 1.8. MÉTODOS DE DIAGNOSTICO RECONOCIDOS Y EN INVESTIGACIÓN

Los sistemas de diagnostico utilizados para rutina y monitoreos de vigilancia se basan en dos líneas principales. Unos son los clásicos por observación histológica y por inmunohistoquímica. Los segundos son Pruebas de electroforesis con inmunotransferencia y los de inmunoensayos por ELISA. Ambas están definidas en el **Manual de Normas de Diagnostico y las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre) (Capítulo 2.3.13)**

Se ha avanzado en la estandarización de procedimientos utilizados para la determinación sistemática de la las TSE. En principio se han desarrollado técnicas simplificadas para extraer la muestra de tejido nervioso, sin abrir la

caja craneana, introduciendo una cuchara, especialmente diseñada, por el agujero occipital. Mediante este procedimiento se pueden obtener tejidos de la médula oblonga, del obex y zonas nerviosas importantes para el diagnóstico, en forma más sencilla.

### **1.8.1. Las pruebas histológicas e inmunohistoquímicas.**

La OIE no ha establecido pruebas prescritas para BSE, pero se considera a la Histopatología tal como se la describe en el Manual Terrestre como la técnica mas apropiada para la determinación definitiva de BSE. Las técnicas de inmunohistoquímica se aceptan como pruebas diagnosticas de referencia.

Estas técnicas exigen la fijación de tejidos y permiten visualizar las lesiones clásicas espongiiformes de la glía, vacuolizaciones neuronales, hipertrofia de astrocitos y amiloidosis cerebral, pero se tarda varios días para su ejecución. Por ello, se ha buscado acotar los periodos utilizando otras técnicas sin fijación de tejidos, en base a la electroforesis y el inmunoensayo (ELISA).

### **1.8.2. La inmunotransferencia, con electroforesis**

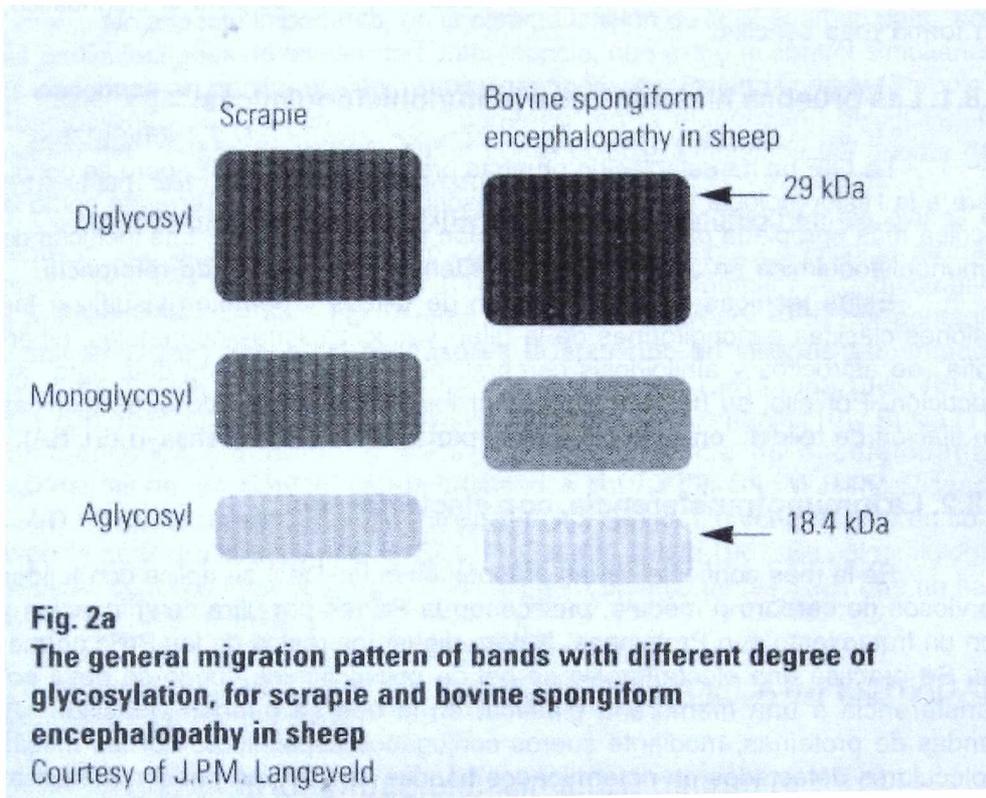
Es la mas confiable de las pruebas bioquímicas y se aplica con tejidos nerviosos de cerebro o médula, purificando la PrPres por ultra centrifugación y con un tratamiento con Proteinasa K para digerir los restos de las PrPc normales. Se practica una electroforesis en gel de poliacrilamida, luego se pasa por transferencia a una membrana plástica, en la que se pueden visualizar las bandas de proteínas, mediante sueros conjugados específicos. Por las masas moleculares detectados en determinados bandas de kDa, se pueden identificar las proteínas PrPres. ( 30-27 kDa, 26-24 kDa, y 21-19 kDa por inmunotransferencia (Ver Figura 1).

### **1.8.3. Pruebas Rápidas**

Se aplican también pruebas más rápidas como las de inmunotransferencia automatizadas de PrPres y enzimoensayo (ELISA). Diversos países utilizan estas pruebas como base de los programas de gran escala, sobre todo en UE, por la magnitud del tamaño de los monitoreos.

En el *Manual Terrestre* de OIE, se mencionan los productos aprobados por la UE, para una aplicación masiva en muestreos. Ellos son Enfer Test (inmunoensayo quimioluminiscente). Platelia inmunoensayo sándwich (con dos anticuerpos anti Prion monoclonales); Prionics Check Western Blot (inmunotransferencia para detectar en forma específica el PrPres);

Figura 1: Extraída de Schreuder BEC. & Sommerville RA. ( Referencia. 68)



Prueba CDI5 inmunoensayo automatizado para detectar PrPres; Prionics Check Lia (Inmunoensayo luminiscente en microplaca). **En el *Manual Terrestre de OIE* se detallan diversos aspectos y amplían las fuentes de informaciÚn.**

Otra técnica importante de diagnostico es la observación con microscopio electrónico (ME) en delgadas secciones de cerebros, de las lesiones vacuolares intracelulares, ligadas a la membrana, sobre todo en las dendríticas de las neuronas. La observación por ME aún en tejidos nerviosos lisados, permite la clásica observación de las fibrillas SAF características, derivadas de la glicoproteína propia de la PrP modificada.

Es importante en el diagnostico experimental, la utilización de ratones transgénicos que expresan la especie, y sirven para identificar líneas de Priones en relación con especies y formas de Encefalopatías. (Ver Capitulo III, Sección 3.6.). También se ha utilizado la identificación por proteínas marcadoras, fundamentalmente las apolipoproteína E (ApoE) para detectar por electroforesis bidimensional en liquido cefalorraquídeo (66) y en orina (67), de casos en incubación, pero hasta ahora no es un método suficientemente confiable.

En el ganado bovino infectado experimentalmente se ha investigado una proteína derivada de PrPre, detectable en orina, pero no hay todavía suficiente evaluación diagnostica. (67) (59)

## CAPITULO II

### 2.1. INFORMACIONES DE INTERES EPIDEMIOLOGICO

Se transcriben las siguientes tablas, con las notificaciones enviadas a la OIE por los Países Miembros, para definir la situación de incidencias anuales de la BSE, considerando desde su aparición en el RU y su posterior presentación en otros países.

#### 2.1.1. Numero de casos Encefalopatía Espongiforme Bovina en el Reino Unido

	Alderney	<u>Great Britain</u>	Guernsey <sup>(3)</sup>	Isle of Man <sup>(2)</sup>	Jersey	<u>Northern Ireland</u>	Total United Kingdom
1987 and before <sup>(4)</sup>	0	442	4	0	0	0	446
1988 <sup>(4)</sup>	0	2 469	34	6	1	4	2 514
1989	0	7 137	52	6	4	29	7 228
1990	0	14 181	83	22	8	113	14 407
1991	0	25 032	75	67	15	170	25 359
1992	0	36 682	92	109	23	374	37 280
1993	0	34 370	115	111	35	459	35 090
1994	2	23 945	69	55	22	345	24 438
1995	0	14 302	44	33	10	173	14 562
1996	0	8 016	36	11	12	74	8 149
1997	0	4 312	44	9	5	23	4 393
1998	0	3 179	25	5	8	18	3 235
1999	0	2 274	11	3	6	7	2 301
2000	0	1 355	13	0	0	75	1 443
2001	0	1,113	2	0	0	87	1,202
2002	0	1,044	1	0	1	98	1,144
2003	0	549	0	0	0	62	611
2004	0	309	0	0	0	34	343
2005	0	60	0	0	0	6	66

## 2.1.2. Número de casos Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) en ganado doméstico del mundo (excluido Reino Unido)

		Fecha: 01.07.2005 (fr)															
Country/Year	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
<u>Austria</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1(c)
<u>Belgium</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	9	46	38	15	11	1(c)
<u>Canada</u>	0	0	0	0	1(b)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2(a)	1	1(c)
<u>Czech Republic</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	7	5(c)
<u>Denmark</u>	0	0	0	1(b)	0	0	0	0	0	0	0	1	6	3	2	1	
<u>Finland</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(a)	0	0	...	
<u>France</u>	0	0	5	0	1	4	3	12	6	18	31(a)	161(d)	274(e)	239(f)	137(g)	54(h)	
<u>Germany</u>	0	0	0	1(b)	0	3(b)	0	0	2(b)	0	0	7	125	106	54	65	
<u>Greece</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
<u>Ireland</u>	15(a)	14(a)	17(a)	18(a)	16	19(a)	16(a)	73	80	83	91	149(d)	246(e)	333(f)	183(g)	126(h)	36(c)
<u>Israel</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0(c)
<u>Italy</u>	0	0	0	0	0	2(b)	0	0	0	0	0	0	48	38(a)	29	7	3(c)
<u>Japan</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3(e)	2	4(g)	5	5(c)
<u>Liechtenstein</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2(a)	0	0	0	0	0	0	
<u>Luxembourg</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0(c)
<u>Netherlands</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	20	24	19	6	
<u>Poland</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4(f)	5	11	11(c)
<u>Portugal</u>	0	1(b)	1(b)	1(b)	3(b)	12	15	31	30	127	159	149(a)	110	86	133	92(a)	13(c)
<u>Slovakia</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	6	2	7	
<u>Slovenia</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2(a)	
<u>Spain</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	82	127	167	137	52(c)
<u>Switzerland</u>	0	2	8	15	29	64	68	45	38	14	50	33(d)	42	24	21(g)	3	2(c)
<u>United Kingdom</u>	See <u>particular table</u>																
<u>United States of America</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(c)

(1) En la Pág. web de OIE, [www.oie.int/eng/info/en\\_esbmonde.htm](http://www.oie.int/eng/info/en_esbmonde.htm) se detallan datos referente a cada país

### 2.1.3. Territorios / Países que han notificado casos de BSE en animales importados únicamente

Fecha: 07.01.2005 (ch)

PAIS/Territorio	Numero de casos	Fecha
Falkland Islands	1	1989
Oman	2	Casos confirmado en 1989
<u>United States of America</u>	1	caso confirmado en Enero 2004

### 2.1.4. Tasa de incidencia Anual de la encefalopatía espongiforme bovina (BSE) en Países Miembros de OIE, que han notificado casos, excluido el Reino Unido

Número de casos nativos por millón de bovinos mayores de 24 meses

Fecha: 21.02.2005

Country/Year	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Austria	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.96	0	0	...
Belgium	0	0	0	0	0	0	0	0	0.61	3.69	1.84	5.53	28.22	25.75	10.54	...
Canada	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.33	0.149
Czech Rep.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.85	2.50	5.78	10.324
Denmark	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.14	6.77	3.35	2.39	1.296
Finland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2.39	0	0	...
France	0	0	0.45	0	0.09	0.27	0.27	1.09	0.54	1.64	2.82	14.73(a)	19.70	20.96	12.01	4.736
Germany	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.07	19.97	17.02	8.71	...
Greece	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.3	0	0	...
Ireland	4.41	4.12	5.00	5.14	4.57	5.43	4.57	20.28	21.39	20.79	22.83	38.17(a)	61.80(b)	88.39	57.81	...
Israel	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.25	0	...
Italy	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14.1	10.60	9.86	2.348
Japan	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.44	0.97	1.96	2.491
Luxembourg	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	14.54	0	...
Netherlands	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1.01	1.03	1.07	10.25	13.19	10.86	3.399
Poland	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.28	1.49	3.578
Portugal	0	0	0	0	0	15.06	18.82	38.90	37.64	159.35	199.50	186.95	137.88	107.80	137.19	93.870
Slovakia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.34	18.73	6.74	24.635
Slovenia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4.34	4.44	4.39	4.585
Spain	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.59	24.23	37.95	46.31	...
Switzerland	0	1	9.2	15.5	30.3	67.6	73.6	48.5	45.4	16	58.7	40.6	49.1	27.93	24.86	3.750
United Kingdom	See particular table															

## 2.2. DISCUSIÓN SOBRE ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

### 2.2.1. Observaciones de la epidemia de BSE en el RU

En el RU, como país emblemático de la BSE, la notificación de la enfermedad, fue creciendo desde 1987 con 446 casos, hasta sus picos máximos en 1992/93, con unos 37.280 y 35.090 notificados respectivamente. Bajó la incidencia en 1994 a 24.4438 y 14.552 en 1995, y mas dramáticamente en 1996 y 1997 a 8149 y 4.393 respectivamente, para ir disminuyendo progresivamente a 343 casos confirmados en 2004. ( Ver Tabla 2.1.1.)

Esto está demostrando que las medidas adoptadas fueron adecuadas, considerando la complejidad y larga incubación de la enfermedad, estimada en promedio, en unos 5 años. Se debe recordar que la prohibición de las HCH de rumiantes para rumiantes de hizo en 1988 y la interdicción para todo destino en 1996.

Ello nos lleva al análisis de los datos de año de nacimiento de los animales afectados, a partir de esas fechas, según las informaciones oficiales, proporcionada por DEFRA UK (Department for Environment, Food and Rural Affairs), en estudios confirmados hasta Junio 2004. ( Tabla No.5)

Año Nacimiento	Casos	Año Nacimiento	Casos
1989	12.735	1995	1.031
1990	5.735	1996	58
1991	4.739	1997	35
1992	3.474	1998	19
1993	2.929	1999	7
1994	2.085		

Resulta muy interesante, la dramática disminución de casos de animales nacidos desde 1996, dada la incubación estimada en 5 años, después de la prohibición absoluta para todo destino, de la HCH . Ello confirmaría las contaminaciones cruzadas, en años posteriores a 1988, con infecciones que aparecieron pasado el periodo promedio de incubación.. Sin embargo, la etiología de los casos aún en el 2004, que señala el cuadro 2.1.1. con 343 datos aún parciales,, dejan lugar a dudas y obligan a hipótesis sobre sus causales, que se discutirán mas ampliamente, en la Sección Patogenia.

### 2.2.2 Observación de datos de incidencia en otros países.

De los datos de la tabla 2.1.2. surgen algunas observaciones interesantes. Como resultado de la prohibición de la HCH en el RU, en su uso para rumiantes, se impulso indirectamente la exportación de la misma desde el RU a diversos países de Europa y otras regiones. Si bien no es fácil rastrear cifras de aduanas en los distintos países, la importación de HCH del RU directamente o triangulada en la UE fue un hecho constatable. Recordemos que la UE, prohibió para rumiantes la HCH recién en 1994, y para todo uso en 2001.

Las cifras marcan la aparición de casos de BSE a partir fundamentalmente de 1992/93 en Dinamarca, Francia, Alemania, Portugal, Suiza, incrementándose paulatinamente en estos y otros países a partir de 1996, hasta 2004/05, lo que corroboraría las infecciones considerando los 5 años aproximado de incubación.

Además el aumento del número de casos detectados en países como Francia, Japón, Alemania, Italia, debe adjudicarse al perfeccionamiento de los sistemas de monitoreo, que captan numerosos casos en animales, en la parte final de la incubación en el momento de matanza, en los mataderos. Incluso en los casos de Irlanda, el incremento de casos registrados se produce por la depoblación de las granjas, en la detección de casos y eliminación de los cohortes que cohabitaban.

Canadá, presentó en 1993, un caso de animal importado, y aparecieron 2 casos más en el 2003. Uno de ellos, fue un animal exportado a USA, donde se detectó el caso. Otros dos nativos ocurrieron en 2004 y en 2005. La prohibición de utilización de HCH de rumiantes para rumiantes, se cumple desde 1997, excepto para su utilización en cerdos y equinos, en acuerdo con igual medida de EEUU y México en el Nafta. La importación de HCH está prohibida de países de Europa y sospechosos de tener BSE. Sin embargo los "records" de exportación del RU señalan importantes cantidades de HCH recibidas por Canadá, aunque los nomencladores de aduana no permiten una estricta clasificación del producto según publicación de Kellar J.A y LessV.W (13) En USA, aparece un caso durante los primeros meses del 2005, que recién en el mes de Junio se confirma, sin haberse podido todavía definir sus causas,

Japón e Israel son dos casos extra-europeos, también posiblemente derivados de importación HCH descodificada en Aduanas desde UE, consignados desde el 2001 para el primer país y en el 2002, para el segundo.

El tema de la responsabilidad de la HCH, y la explosión de la BSE, en RU y en el mundo, se debe a dos factores principales. El origen posiblemente fue el cambio de técnicas en la elaboración de la mayoría de las fabricas de HCH, por reducción de la cantidad de solvente para extraer grasas, con tratamiento de menor temperatura a la harina de carne y hueso o "rendering". Desde 1980 al 1983, este cambio de proceso puede haber favorecido una menor destrucción del agente PrPsc del Scrapie en los ovinos y a la recirculación de los PrPbse en los bovinos faenados, que fueron al "rendering". El segundo aspecto es la dificultad de identificación en las Aduanas europeas de los Códigos arancelarios de las HCH de origen bovino-ovinos, exportada para diversos usos a múltiples países, desde RU y otros países europeos, en las décadas del 80 y gran parte de 90, diseminando el agente. Se calcula, que por lo menos 300.000 toneladas de HCH se exportaron al resto del mundo entre 1996 y 1999, según estimaciones de la UNO, EUROSTAT y FAO. (14) Este tema, considerando las largas incubaciones de la BSE es uno de los más importantes, para dictaminar si un país está libre, aunque la enfermedad no aparezca y aparentemente no tenga en sus importaciones, consignado la introducción de HCH, de países bajo riesgo.

### 2.2.3 Observaciones sobre prevalencias por establecimiento en el RU

Uno de los temas que no siempre han podido ser estudiados con la profundidad que merece, quizás por las dificultades que involucra, es el tema de las tasas de ataque de BSE por establecimiento. No siempre se han podido hacer seguimientos de interdicción de la evolución de casos, en un establecimiento afectado, por aplicar la eliminación de todos los animales cohortes bajo exposición de riesgo. La solución sanitaria afectó, tanto en el RU como en otros países de EU, el conocimiento de la difusión de enfermedad en el tiempo, frente a las fuentes potenciales de infección en animales cohortes. La eliminación de los posibles afectados que incubaban la enfermedad, no nos permite conocer con exactitud la magnitud de la infección por establecimiento.

Sin embargo, tomando datos oficiales de DEFRA en el RU, sobre todos los establecimientos afectados, como focos por año, y el número total de animales con BSE en igual lapso, pueden dar una idea - si bien no exacta, aproximada - de la realidad, para inferir el grado de difusión de la enfermedad, por establecimiento

La tabla No. 6, señala el número registrado de establecimientos con animales afectados, considerados como focos, en el RU por año, y se acompaña la cantidad de casos de BSE registrados en el mismo periodo, que ya se presentaron en la Tabla 2.1.1. Ello sirve para establecer la relación de totales, entre animales y establecimientos afectados por la BSE anualmente.

#### Relación entre Establecimientos y número de animales afectados por BSE por año, en el RU. ( Tabla N.6)

Año	No. Establecimientos	No. Animales	Relación Est/ar
1988	1.654	2.514	1: 1,5
1989	4.509	7.228	1: 1,6
1990	7.591	14.407	1: 1,9
1991	11.271	25.359	1: 2,24
1992	16.295	37.280	1: 2,28
1993	17.198	35.090	1: 2,04
1994	13.267	24.438	1: 1,80
1995	9.015	14.562	1: 1,6
1996	5.624	8.149	1: 1,4
1997	3.304	4.393	1: 1,3
1998	2.482	3.235	1: 1,4
1999	1.792	2.301	1: 1,3
2000	1.138	1.443	1: 1,2
2001	1.010	1.202	1: 1,2
2002	993	1.144	1: 1,1
2003	529	611	1: 1,1
2004 Junio	178	343	1: 1,9

De la observación de la tabla, cabe destacar:

1. La cantidad de animales por establecimiento, es extremadamente baja, solo se supera en algo mas de 2 animales promedio, por establecimiento, en los años de mayor incidencia, desde el 1991 a 1993

2. Considerando que todos los animales de un establecimiento, suelen estar bajo semejantes condiciones alimentarias y de manejo, y por lo tanto de parecido riesgo potencial, cabe preguntar:

¿qué factores intervienen para que aparezca tan bajo número de casos individuales, si la difusión del agente es alta, considerando el número de establecimientos afectados?

3. Una respuesta sería que la presencia del agente causal en la alimentación no debe haber sido pareja y por lo tanto la ingestión de dosis infectantes, solo fue suficiente para muy pocos.

4. La otra posibilidad, si bien todavía no se detectó técnicamente, es que exista alguna predisposición genética en el bovino, que hace animales selectivamente predispuestos, como en Scrapie para las ovejas o CJD en el hombre

5. Por último que puedan existir componentes causales coadyuvantes, que no conocemos todavía.

Aspectos de estos temas serán tratados con más en detalle en la Sección Infección y Patogenia.

## CAPITULO III

# INFORMACIONES SOBRE CARACTERÍSTICAS DE LA INFECCION Y PATOGENIA DE LA BSE. RELACIÓN CON OTRAS TSE.

### 3.1. Etiología de las TSE y la estructura del Prión (Proteinaceous Infection Particle)

El hecho que se reconozca el rol fundamental de las proteínas Priónicas (PrP), como factor muy importante para la etiología de las TSE, no deja de presentar serias incógnitas todavía, para interpretar su patogenia y entender la enfermedad, en muchos aspectos. Los PrP son proteínas que desde el punto de vista bioquímico, puede clasificarse como sialoglicoproteínas, pero para definir sus actividades patógenas, se debe conocer la fracción molecular infectante.

Para ello se debe previamente co-purificar el PrP, junto con la fracción de membrana celular a la que esta adherido, solubilizar a esta y luego efectuar centrifugaciones y digestiones proteolíticas y nucleolíticas. Las proteínas resistentes a la proteinasa K (PrPres, de donde deriva el nombre prion), demuestran ser del tipo hidrofóbicas, y muestran una secuencia relacionada no solo con el ácido nucleico que las codifica, sino además con el gen que las codifica. Es indudable que la estructura primaria del PrPc, deriva de ADNc, de su especie (ADN complementario) (15)

Esta PrP proteína, utilizando sueros específicos, se la ha encontrado en extractos de varios tejidos normales, además de los que son propios de la enfermedad.(16)

Se resumen los principales progresos, en las observaciones estructurales, que sirven para intentar orientarse, en las acciones del PrPres en el proceso de las TSE.

- En el hamster el PrP, consta de 254 aminoácidos, agrupados en secuencias que pueden clasificarse en distintas hélices o cadenas, que tienen una terminal de 22 aminoácidos, que es una secuencia que sirve para entrar en el "lumen" del retículo endoplasmático celular, donde se enclava. (17)
- Los aminoácidos 53-93 están compuestos por octopéptidos repetidos, que en el caso del bovino es de cinco a seis veces. (18)
- A continuación sigue un ensanchamiento de la cinta proteica, de 20 residuos hidrofóbicos, comenzando aproximadamente por los aminoácidos en posición 106, (cuya funcionalidad aun no se interpreta), hasta llegar al puente bisulfítico entre cisteínas 179-214. con dos sitios de N glicosilación en los puntos 181 y 197, (o sea de remoción de azúcares)
- Es importante considerar que los puntos con N glicanos, (de glicosilación) son diversos y que por cálculo se podría demostrar 401 isoformas de PrP posibles.. Por ejemplo, los residuos de asparagina pueden ser glicosados, lo cual debe ser importante para la formación de distintas cepas de PrP. Por ejemplo el (GPI) glicofosfatidilinositol, se puede combinar con 23 residuos de aminoácidos desde

el C terminal. El ancla GPI se pega en forma clásica al residuo de serina 231, a través de la combinación fosfoetanolamina. (19)

- Como consecuencia importante, se ha observado que el PrP se adhiere a la capa externa de la membrana plasmática en células de cultivo, a través de GPI, y en linfocitos a una membrana como "microlocalización" designada en inglés "raft" (balsa).(19)

- El mecanismo de internalización celular del PrP no es todavía conocido, pero el descubrimiento de receptores de la superficie celular, podrán en el futuro próximo elucidar el camino endocelular de esta proteína.

Una estructura secundaria, fue descubierta por espectroscopia de resonancia magnética (NMR) entre los aminoácidos 121-231 que es el punto designado como centro estructural del PrP. La región N terminal se considera entonces no estructural y se la refiere como la cola flexible ( Ver Figura)

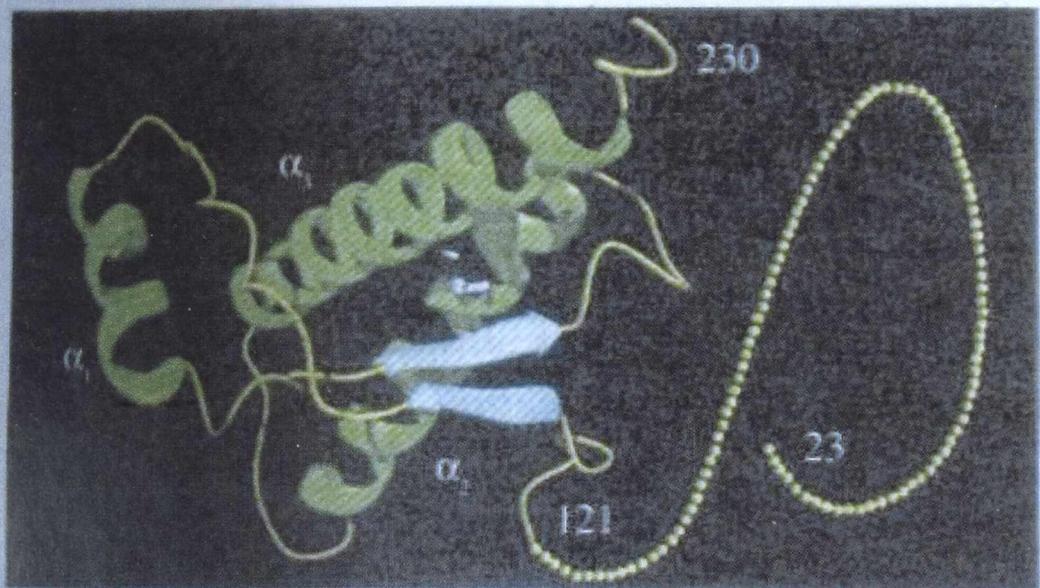
En los diez últimos años, se han obtenido valiosos datos, sobre el rol de PrP en la patogenia de las TSE. Las mutaciones del gen PrP, se reconocen como responsables del desarrollo de las formas hereditarias de TSE. Mas adelante se describen experiencias con ratones transgénicos que expresan a PrP homólogos y heterólogos, que definen correlativamente el grado de susceptibilidad de la especie, y el nivel de barrera inter-especie. (20) (21)

La figura II muestra una estructura tridimensional Proteína del Prion Bovino ( secuencia aminoácidos 23-230) mostrando las hélices de los "strands" beta y alfa. La PrP normal tiene un 43% de estructura con hélice alfa y 3% de hélice beta. Los PrPsc o anormales, tienen en cambio un 34% de hélice alfa y 43% de beta. Esta transformación ha sido lograda también artificialmente "in vitro", como forma de estructura físico-químico, pero sin actividad biológica. (22)

La asociación de la enfermedad a la forma isomorfa de la proteína, (PrPsc o PrPres) bajo el tratamiento proteolítico, con digestión de proteasa, se presenta con un centro resistente, que típicamente reconocido por electroforesis, es designado como PrP 27-30, por el Peso Molecular correspondientes a las bandas de di y monoglicosilado del PrPres, cuya estructura anormal es derivada del Prion Normal (PrP) original. ( 23)

La presente Tabla, señala las estructuras de la proteína 27-30, del Prion normal (PrP) y de PrPsc, después de la digestión proteolítica. (Extraído de Cl. Lasmezas Referencia 24)

Porcentaje	Beta cinta	Alfa hélice	Beta pliegue	Cola flexible
De estructura PrP	3	42	32	23
PrPsc	43	30	11	16
PrP 27-30	54	21	9	16



**Fig. 1**  
**Three-dimensional structure of the intact bovine prion protein (23-230) showing the helices,  $\beta$ -strands, segments with non-regular secondary structures and the flexibly disordered 'tail' of residues 23-121 represented by dots**

(88)

Fig.2. Extraída de CI Lasmezas. (Referencia 24)

¿ Cómo la forma anormal PrP<sup>Sc</sup>, y por que factor, logra transmitirse o multiplicarse, transformando a las otras moléculas de conformación normal? Ello es todavía desconocido. Se sabe que el PrP<sup>Sc</sup> sigue un proceso de nucleación de paso lento y limitado, y que genera una polimerización de PrP<sup>Sc</sup>, de tipo amiloidea. (25), pero nada más.

Es importante destacar, para la interpretación de la patogenia, que a la observación por microscopio electrónico, del material derivado de cerebros de animales con BSE, con un titulo infectante de 10<sup>6</sup> DL50, de bovinos infectados por vía oral; no fue posible encontrar ningún resto de ácido nucleico, ya sea del huésped o de otro origen, que pudiera avalar teorías de elementos complementarios al Prión. (24).

## **3. 2. PATOGENIA DE LAS TSE**

### **2.2.1- Funciones de los Priones: (PrP) o (PrPc) (Priones celulares)**

Debe señalarse que todavía no están claras las funciones de las proteínas priónicas normales (PrPc) en el Sistema nervioso. Usando ratones, se encontraron priones (PrPc) en las vesículas sinápticas de las neuronas, pero en ratones transgénicos "knock-out" (Pr.Poo) , que no poseen gen de expresión de priones estaban ausentes. Al parecer se asocia los priones (PrPc) con las conexiones pre-sinápticas y las vesículas sinápticas y su relación con el cobre, como factor activo en las conexiones nerviosas. Un aspecto al que se vincula a los priones normales , es su asociación a un factor normal "neuroprotector" de las neuronas, que actuaría como regulador de la necrosis celular por apoptosis.(muerte celular fisiológica)

El desarrollo de ratones transgénicos "knock-out" (Ver Capitulo III- 3.3.6), dieron base para pensar, que sin presencia del gen PrP, no había inducción a la producción del agente de las TSE, y por lo tanto a la enfermedad. Sin embargo se logró la demostración de bajas infecciones en estos ratones, luego de veinte semanas post-inoculación, en los que se presentó, aunque reducida, algún grado de infección. La producción de Priones en el organismo, sin el gen inductor, es otro problema actual, sin clara respuesta. (26) (27)

### **3.2.2. Propagación de los Priones (PrPres) en el organismo**

En el Scrapie, se conoce desde 1970, que el agente de las TSE, presenta un primer periodo de propagación y amplificación en tejidos linfoides, antes de entrar en la fase de ataque a las células neuronales, que aparentemente se produce en a mitad del periodo de incubación. (28).

Las investigaciones actuales, confirman la evidencia que los priones en las TSE desarrollan una acumulación en las células foliculares dendritas (FDCs) del sistema linfoide, y linfocitos B, antes de atacar las terminales nerviosas, que inervan los ganglios linfáticos. Por vía nerviosa, llegarían a la medula y de allí al cerebro y otros tejidos del SNC. Esto que es consecuente con la teoría de los virus, resulta difícil de explicar para el traslado de una proteína, faltando resolver numerosos puntos oscuros.

La hipótesis actual apoya que existiría un proceso de "nucleización" en la célula, donde se convertiría el PrPc en PrPres, en un lento y limitado paso, en el que se produciría la polimerización mediante composición de los oligómeros del PrPres en polímeros amiloideos. (25)

Recientes investigaciones considerarían la posibilidad de formación de diferentes cepas de TSE, consistentes con una única base estructural de PrPc. La hipótesis sostiene la multiplicidad de conformaciones estructurales derivadas por glicosilaciones como mencionamos en el punto 3.1. A partir de 1996, se viene demostrando por Electroforesis, diferentes patrones derivados del grado de la glicosilación del PrPres. La motilidad de las proteínas en el gel, se sabe que depende del tamaño del fragmento de la porción proteasa resistente. De

sus distintas conformaciones surgiría la diversidad del plegamiento proteico (29), y por lo tanto las cepas.

Es interesante la demostración de diversas cepas de PrPres, sobre la base de su identificación y diferenciación de epítopes antigénicos, reconocidos por anticuerpos monoclonales, que detectan las proteínas con pliegues anormales. (30)

En el caso de la BSE, existe una aparente menor diseminación "periférica" linfoide, que en Scrapie. Por pruebas biológicas en ratones (31), se demuestra que es evidente la infección de placas de Peyer en el ileum, por infección vía oral del bovino. Otra importante detección de PrPsc infecciosos ha sido hecha en el año 2005, por Wells GH. et al. en las tonsilas linguales en bovinos en estado preclínico.(69)

En parte la dificultad de estas demostraciones radica en la necesidad de bioensayos bovino-bovino, por causa de la barrera de especie bovino-ratón, que hace menos sensibles las pruebas en ratones. Ello será ampliado al tratar el capítulo de la sensibilidad genética y de la virulencia de cepas de PrPres.

Resulta indicativa la Tabla 7, que señala la distribución del agente de BSE, demostrado por infectividad, en bovinos infectados con 100 gr de cerebro (Datos extraídos de European Commission (EC) (2002 ) Scientific Steering Committee SSC (32)

**Tabla VII**

<b>Tejido</b>	<b>Tiempo post-infección en que se detectó el agente</b>
Cerebro-corteza cerebral y Médula caudal	32-40 meses
Médula Espinal	32-40 meses
- Nivel Cervical C2-C3	
- Nivel Toráx. T10-T11	
- Nivel Lumbar	
Gánglio Trigémino	32-40 meses
Ileum distal	6-14 meses; 18 meses; 36-40 meses
Médula osea (esternón)	38 meses
Tonsilas linguales	45 meses

### **3. 3 - LA TRANSMISIBILIDAD DE LAS TSE**

Desde que se detectó la transmisión inter.-especies de las TSE, se plantean varios componentes que deben ser considerados en la difusión de la enfermedad, vinculados con la Dosis Infectante, la cepa del agente, la vía de infección y las características genéticas del huésped.

#### **3.3.1. Dosis infectante**

El cálculo de la DI50, a partir de tejidos infectantes del bovino, se practica

en ratones, por lo general de cepas estándares, como las recomendadas por la SSC de la EC.

Por exposición oral se demuestra que el bovino se puede infectar con 1 g de cerebro conteniendo un título de  $10^3$  DI50, según el SSC de EU (32). Comunicación personal de SAC. Hawkins del Instituto de Weybridge, (33) considera que hasta 0,1 g de ese material, que se estima contiene  $10^3$  DI50, puede ser infectante para el bovino. Se estima que la vía de entrada en la BSE, es extremadamente importante para producir la infección, por ejemplo se estableció, que la sensibilidad comparativa de la vía oral en el bovino, es 60.000 veces menos eficiente que la vía intracerebral (32). Además la ruta oral ofrece variados periodos de incubación, debido a las condiciones del pasaje, que debe atravesar la vía digestiva, para llegar al SNC.

### **3.3.2. La única cepa del agente de BSE.**

Es un hecho evidente que surge del análisis de todas las publicaciones, hechas hasta el presente, y considerando las diversas tecnologías, la existencia de una única cepa del agente causal de BSE. Desde la uniformidad de las lesiones de cerebro, las pruebas de electroforesis para medir la motilidad del centro proteasa resistente, los perfiles de la transmisión en ratones, aparece consistente la idea de que solo se puede expresar una única cepa para BSE, a diferencia con lo que ocurre en Scrapie o CJD.. Ello es aceptado, a pesar de existir estructuralmente en el PrP<sup>sc</sup>, la posibilidad de múltiples mutaciones, como se indico al tratar los aspectos estructurales de la proteína del Prion.

### **3.3.3. Influencia del genotipo del huésped**

Se ha confirmado que el genotipo del huésped en varias TSE, tiene gran importancia en la incubación de la enfermedad y en su resistencia. (34) (35). En el caso de la BSE se ha estudiado las secuencias de los nucleótidos del gen de PrP en bovinos y de otras partes de su genoma, para establecer si existían variables relacionadas con la mayor susceptibilidad o con la resistencia. (36)

Hasta aquí se ha detectado muy poca variabilidad en el gen bovino. Si bien se han visto unas cinco o seis copias del segmento guanina - citosina, no parece que tengan mayor efecto en la incubación y ocurrencia de la enfermedad. Sin embargo, comunicaciones personales de JW Wilesmith, (DEFRA- Weybridge) (UK) expresan haber encontrado sub-grupos bovinos que aparecerían, con mayor susceptibilidad que otros, en las observaciones epidemiológicas.

En este aspecto es conveniente comparar la BSE, detallando los avances logrados en Scrapie, sobre la investigación genética, que se viene llevando a cabo desde hace años. Se ha observado en Escocia, desde hace tiempo, líneas de lanares de la raza Cheviot, que presentan clara diferencia en el periodo de incubación de la enfermedad. La diferencia radica en un gen definido como Sip (Scrapie incubation period) con dos haelos sA (short) pA (prolonged) (37)

En los último años, se ha avanzado en la identificación de tres codones (") polimorfos del PrP gen, con importante influencia en la incubación del Scrapie.

El codón 136 con valina (V), fue detectado coincidente con la susceptibilidad, así como con alanina (A) lo fue en relación con la resistencia. En el codón 171, la glutamina (Q) y la histidina (H) se asociaron a la susceptibilidad, mientras arginina, lo fue a la resistencia. En esta complejidad los estudios realizados demostrarían, mayor susceptibilidad a determinadas, combinaciones en codones 136, 154, 171, que se expresan según las combinaciones alélicas de los genotipos.

La tabla No.8 adjunta, demuestra la incidencia de Scrapie en el RU, según grado de resistencia o susceptibilidad de acuerdo a 15 genotipos analizados, en varios años.

Estas investigaciones básicas, han servido para la organización de Planes Nacionales de control genético del Scrapie, no solo en el RU, sino en Francia, Holanda, Alemania y USA: (38)

GENOTIPO (·)	CASOS POR MILLON observados	- CLASE DENTRO PLAN NACIONAL del RU
ARR/ARR	0	Genéticamente resistente
ARR/AHQ	0,3	Gen. resistente pero con selección
ARR/ARQ	0,4	Gen, resistente pero con selección
ARR/ARH	0	Gen, resistente pero con selección
AHQ/AHQ	5	Poca resistencia, debe controlarse
AHQ/ARH	9	Poca resistencia debe controlarse
AHQ/ARH	0	Poca resistencia, debe controlarse
ARH/ARH	2	Poca resistencia, debe controlarse
ARQ/ARH	5	Poca resistencia, debe controlarse
ARQ/ARQ	37	Poca resistencia, debe controlarse
ARR/VRQ	6	SUSCEPTIBLE. Debe controlarse
AHQ/VRQ	0,7	ALTAMENTE SUSCEPTIBLE
ARQ/VRQ	225	ALTAMENTE SUSCEPTIBLE
ARH/VRQ	405	ALTAMENTE SUSCEPTIBLE
VRQ/VRQ	545	ALTAMENTE SUSCEPTIBLE

---

(\*) Codón: Secuencia de tres bases de nucleotidos en el ADN, que especifica un aminoácido o representa una señal de cese o de iniciación de una función

## TABLA VIII

Los periodos de incubación del Scrapie, tienden a variar con los genotipos, siendo menor en los más susceptibles.

La transmisión de BSE a ovejas, bajo condiciones experimentales, es relativamente baja. Los genotipos de ovinos ARQ/ARQ, ARQ/AHQ y AHQ/AHQ, se presentan hasta ahora en las investigaciones actuales, como los genotipos más susceptibles a BSE. (39) También se observó, que los tipos ARR/ARR son de ovejas claramente resistentes a la BSE. Estas investigaciones servirán para aclarar los aspectos de susceptibilidad genética de BSE, en un futuro.(40)

### 3.3.4. Estudios sobre transmisión materna de BSE

En Scrapie, la transmisión vertical a través de la placenta y de los embriones ya sean lavados o no, es un hecho comprobado desde hace tiempo. Investigaciones en RU y USA, en Scrapie, demostraron que es posible la contaminación a la descendencia, aunque no parece ser la vía más frecuente ( 41) (42) (43) El tema fue muy discutido respecto a la BSE, máxime ante la persistencia de casos, nacidos después de la prohibición de la HCH.

Un experimento demostrativo fue dirigido y realizado por Wilesmith et al (44), en el Veterinary Laboratory Agency de Weybridge que se inició en 1990 y termino en 1997 siete años después. Se tomaron 300 crías bovinas, nacidas de madres que enfermaron de BSE, comparadas con 300 crías de vacas sin antecedentes de BSE de más de seis años de edad. Las crías de ambos grupos fueron mantenidas y observadas por siete años y las conclusiones permitieron observar, que existía una diferencia significativa entre los nacidos de vacas enfermas, respecto de las sanas.

De la descendencia de las vacas con BSE, el 9,7 % enfermó, (rango con 0,95% fue 5,1%- 14,2%), mientras que en las descendencias de las vacas originalmente sanas, enfermaron el 3,2% de las crías (rango de 0,95 fue 1,8%- 5,9%).

En la amplia discusión y análisis, que provocó este trabajo, y las observaciones epidemiológicas derivadas, se ha avanzado en las siguientes conclusiones:

1. La transmisión materna, tiene incidencia en la transmisión de la BSE, aunque aparentemente, puede estar influida por vinculaciones genéticas.

-----  
(·) A= alanina ; R= arginina ; Q= glutamina; H = histidina; V= valina

2. En los estudios de la epidemia en el RU, parecería que algunos casos estarían asociados a la transmisión vertical , los cuales indicarían que el riesgo relacionado con el momento de la incubación de la enfermedad, de la aparición clínica de los síntomas aumentaría cuando esta cerca la madre . ( Datos de Wilesmith JW, Wells GA y Ryan JB.- Ref. 44)

Experimentaciones repetidas y controladas desde 1990, en las que participa la IETS (Internacional Embryo Transfer Society) hechas con estricta

rigurosidad, demuestran que hasta ahora, no ha podido demostrarse transmisibilidad de BSE por embriones ni semen. Sin embargo, en muchos países, subsisten todavía las medidas precautorias de importación, con la prohibición de embriones y oocitos, provenientes de países afectados, mientras el conocimiento genético, no se haya aclarado lo suficiente. Respecto a semen, o vesículas seminales, todas las investigaciones realizadas en diversos países del mundo, han sido negativas.

### **3.3.5. La transmisión horizontal y ambiental en el caso de la BSE**

También en este caso valen las vinculaciones con otras TSE. En el Scrapie, se conocen históricamente casos de transmisión por contagio horizontal, en rebaños relacionados, (45) (46) (47) ya sea entre ovejas y/o cabras, tanto en RU como en USA. En ellas la vía oral es la más reconocida, con asociaciones del tejido linfático del tracto digestivo, como tejido de desarrollo de la infección. La detección del agente en heces, saliva, orina, calostro y leche, (48)(49)(50) fue siempre negativa en todas las investigaciones realizadas desde hace años. Considerando que la placenta juega un rol principal en el desarrollo del Scrapie, no cabe duda, que es muy probable que la contaminación desde la placenta al medio, sea una vía importante. (51). En esos tejidos se ha demostrado una gran supervivencia de material conteniendo Priones y atendiendo su resistencia a la inactivación, no es dudoso que se pueda mantener en el ambiente durante años. Por lo tanto, se sugiere que en la transmisión del Scrapie no esta descartada la importancia de la infección vía ambiental. Un caso demostrativo, ocurrió en una de granja en Islandia, donde hubo animales con Scrapie y quedó vacía de ovinos por muchos años. Vuelta a ser poblada, se re infectaron ovejas, mas de diez años después. (52) (53).

Otra TSE en la que la contaminación horizontal, debe mencionarse es la Chronic Wasting Disease (CWD) en los ciervos de USA y Canadá, donde no aparece con claridad la vía de contagio en animales que viven en parques, dentro de ambientes naturales. Como medida precautorias se establecen en el Programa de Control, la vigilancia de todas las variables posibles, desde el alimento hasta la depoblación de campos infectados y el máximo monitoreo posible, en las poblaciones identificadas como sospechosas.

En el caso de BSE, donde no se ha encontrado infección vía placentaria, ni en los líquidos excretorios, se hace difícil pensar, además de la vertical, que la vía horizontal, sea muy importante para la transmisión de la enfermedad. Sin embargo no se debería completamente descartar, dado el mantenimiento de niveles epidemiológicos en los últimos años, sin causas por ahora explicables. De cualquier forma, si llegase a existir, se reconoce que la contaminación horizontal, en el cuadro infeccioso de la enfermedad en el bovino, es de un bajo riesgo.

### **3.3.6. La BSE y la barrera de las especies**

Un hecho trascendente en el estudio de las TSE, es su capacidad para pasar de una especie a otra, generando procesos patológicos, con características

especiales. Estos procesos, como ya se indicó anteriormente están vinculados con componentes genéticos, como es el gen que codifica los priones, y el genoma propio de la especie, como ya se describió en los casos del Scrapie.

Un aspecto que ha hecho avanzar el estudio de las relaciones inter-especie ha sido el desarrollo de las cepas de ratones transgénicos, donde se logró deletar el gen vinculado a la formación de Priones (Pr.Poo gen). Ello ha permitido introducir en el ratón el gen formador de Priones de la especie a investigar, sea el bovino, ovino o humano. Por ejemplo mediante esta técnica se ha logrado desarrollar ratones, que expresan el gen bovino y lo hace 10 veces más susceptibles a la BSE que el propio bovino, y 10.000 veces más susceptible que las cepas de ratones no modificados genéticamente. (54)

En el caso de las BSE, es reconocido además el posible pasaje por el "Rendering" del material infeccioso del scrapie ovino al vacuno, pudiendo originar en este la aparición de la encefalopatía. También está demostrado el pasaje de BSE al ovino por inoculación experimental y por transmisión oral, desde 1993 en el laboratorio de Weybridge en RU, (55)

Además se ha observado la exposición natural a la BSE en los siguientes animales: ungulados cautivos y silvestres como gran kudo, nyala, eland, y oryx (5). y felinos salvajes como cheeta, puma, leon, ocelot, tigre (5), gatos domésticos (4) y cabras (Oliver, 2004).

Independientemente, se ha logrado la infección experimental de BSE, además del ratón y hámster, ya mencionados, a otras especies como: cerdo, monos macacos, marmota y lemures.

La transmisión al hombre por la variante de Creutzfeldt-Jakob, merece un capítulo aparte.

## CAPITULO IV

### 4.1. La variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) y la BSE

La enfermedad de Creutzfeldt -Jakob en el hombre fue descrita por los autores del mismo nombre, hace mas de 80 años. Es una encefalopatía del tipo espongiiforme, que aparece normalmente en personas de más de 60 años. Según su etiología se clasifica como esporádica en un 85%, cuya prevalencia es del orden de 1:1.000.000 de personas y en un 10% á 15% con un origen claramente genético, por mutación del gen que codifica la proteína Priónica. También puede ser transmitida iatrogenicamente, introduciendo la proteína mutada con la hormona de crecimiento derivada de la hipófisis humana, o por implantes de cornea o duramadre de portadores. Si bien no hay casos denunciados por transfusiones sanguíneas, se recomienda la leucodepleción, a la sangre de todo individuo dador con más de seis meses de estadía en RU o países europeos con epidemia persistente. La enfermedad es de curso grave y el enfermo muere en un año, aunque los periodos de incubación pueden llegar hasta 10 años. Actualmente se considera que todas las TSE humanas pueden ser transmisibles, incluso las de claro origen genético.(56)

Se han descrito numerosas mutaciones del gen PrPres en CJD. En el hombre codifica 253 aminoácidos, incluidos en cuatro octapéptidos contiguos con otros nonapeptidos de similar secuencia. Se conocen hasta hoy 14 puntos y ocho diferentes octa repeticiones donde se insertan mutaciones asociadas a la variación genética de la enfermedad. De ellas las más comunes, están asociadas a la mutación en el codon 102 (·)(Pro-Leu) y Codon 200 (Gln-Lis) y algunas al Codon 129 (Met-Met Homocigota). Recientemente se ha detectado por Zeidler et al .(57) resistencia en el Codon 129 cuando es heterocigota(Met-Val).u homocigota cuando es a Val-Val. La WHO tiene publicados, cuadros que indican las características genéticas de las distintas mutaciones, sus epidemiologías y cuadros clínicos respectivos.(58)

Los trabajos de Windl et al (59), analizando el genoma humano, en 120 casos sospechosos de CJD en el periodo 1990-93, por técnicas de PCR (Polimerasa Chaín Reaction) demuestran que el polimorfismo del codón 129, correlacionaba con aumento a la susceptibilidad a CJD, en relación con Met/Met 11; Val/Val 4 y Met/ Val 1.

Las investigaciones desde el año 2004 en Israel se han continuado con estudios de prevalencia por familia, haciendo los seguimientos y monitoreos correspondientes. En 2001, un importante hallazgo, fue realizado por Shaked et al (59), con aislamiento en orina de Priones en casos humano, con seguimiento familiar. También se demuestra en dicho trabajo la presencia de priones malignos en orina, de bovinos afectados por BSE.

En marzo de 1990, en el RU se produjeron los dos primeros casos de CJD en dos jóvenes adolescentes, un segundo foco ocurrió en 1995 y meses después ocho nuevos casos ocurrieron enfermando gente joven. Otros veinte casos se diagnosticaron entre Marzo de 1996 y Octubre de 1998, uno de ellos en Francia.

La similitud de lesiones producidas por la inoculación de BSE a monos por vía intracerebral, con las de la encefalopatía bovina clásicas en bovinos, fue el factor determinante sobre la sospecha de una asociación causal. Ello fue ratificado, con las experimentaciones en ratones transgénicos, modificados con el Gen del Prion Humano, que dieron con certificación estadística, diferencias con ratones no modificados. Por último los trabajos que estudiaron por Western Blot, las características de glicosilación del Prion tratado con Proteasas K, confirman la presencia de líneas, bastantes semejantes entre BSE y la variante del CJD.

Los trabajos de Collinge J et al (60), son bastante concluyentes al respecto. En ellos se diferencian tres patrones de proteasa-resistentes PrP de CDJ por Western Blot. Dos tipos, los 1 y 2 son comunes a las formas esporádicas y iatrogénica. El tipo 3 de la variante presenta características en las líneas de glicosilación diferentes, pero similares a la que produce la BSE. También utilizando líneas de ratones PrP<sup>o</sup>, que expresaban el Prion humano, se demuestra cierta vinculación de la vCJD con la BSE en los tiempos de incubación y en los patrones por Western Blot.

Desde 1995 hasta 2004, los casos registrados de vCJD fueron 143, comparado con los registros desde 1990 a 2004, que consignan 740 de la CJD Esporádica, 46 iatrogénica, 41 familiar o sea un total de 993. (Defra Statistics 14.09.04) ([http:// www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm](http://www.cjd.ed.ac.uk/figures.htm)..)

En la relación entre BSE y vCJD, aunque las evidencias no son terminantes, son muy reveladoras de algún tipo de asociación entre ambas entidades, apoyadas por las observaciones epidemiológicas, bioensayos en ratones transgénicos y por pruebas bioquímicas de Western Blot.

(·) Pro= Prolina, Leu= Leucina, GLN= glicina; Met= Metionina; Val=Valina

## **CAPITULO V**

### **LOS FACTORES ECONOMICOS RELACIONADOS CON LA BSE**

No cabe duda que desde la década del 90 la BSE tiene tanta o más importancia económica que científica. La aparición de la posible vinculación con la vCJD en el hombre, la ha transformado en la enfermedad transmisible zoonótica, si no la más importante, sí la más temida.

Sus repercusiones económicas, podemos definirlas en tres campos principales.

- Las pérdidas por deterioro animal y los costos derivados del diagnóstico y control.
- Las implicancias por prohibición en el uso de la harinas de carne y hueso (HCH).
- Las pérdidas por cierre de mercados comerciales.

#### **5.1. Pérdidas por deterioro animal y costos derivados del control**

Si bien la cantidad de animales atacados es proporcionalmente reducida, dentro de las poblaciones animales, no lo es la cantidad de animales bajo sospecha, ante la aparición de un solo caso. El sistema de matanza generalizada, para eliminar la sospecha, bajo el concepto de "muerto el perro se acabó la rabia", en realidad no satisface las condiciones para superar las causales de riesgo, considerando que más allá de los animales del campo atacado, no sabemos cuantos han consumido el mismo alimento o han estado bajo condiciones de incubación de la enfermedad.

Ello ha llevado en casi todos los países donde apareció la enfermedad, a un estado de psicosis, en los que las matanzas no siempre racionales de los animales, han elevado los costos económicos a valores incalculables. Por ejemplo, en la UE sacrificaron entre Enero y Octubre del 2002, a 46.618 animales asociados a casos, cuando los reales reportados como positivos fueron 2.230 y entre los asociados, sólo 13 fueron positivos y 86 dudosos.(62)

Según DEFRA, en el Reino Unido la cantidad de animales sospechosos fue desde 1988 a Febrero del 2005 de 223. 774, de los cuales fueron confirmados 179.095 . Las interdicciones y los controles regionales, llevan esa cifra a números económicamente no fáciles de calcular. En el RU el programa de monitoreo incluye más 20.000 muestras al año de alimentos, para detectar las especies componentes

A estos costos, debe agregarse el de los controles obligatorios a todo animal con más de 30 meses de edad, destinado al consumo y los monitoreos activos que hoy se desarrollan no solo en los países atacados, sino como medida precautoria en todo el mundo, máxime en aquellos que pretenden ser exportadores.

En la UE en 2001 el programa incluyó la cifra de 8.516.227 bovinos, monitoreados por métodos de pruebas rápidas, para detección preventiva de animales destinados a consumo. (61) El valor de ello, no está totalmente

establecido, pero sólo al precio aproximado, de unos U\$S 40 por kitt de diagnóstico, resultan exclusivamente para este rubro, cifras superiores a los 350 Millones de dólares americanos, sin calcular los gastos accesorios del monitoreo

Esto es una carga, no sólo en países infectados, sino libres como la Argentina, donde los monitoreos regulares, superan las 1000 muestras por año y son necesarios para demostrar su indemnidad. Si llegan a ponerse en practica las nuevas disposiciones de monitoreo, dictadas por OIE en 2005, los costos y operaciones de muestreo y kitts de diagnóstico, sólo en países como la Argentina, van a llegar a decenas de millones de dólares. El obvio, que deberá analizarse y plantearse el problema sobre bases más racionales y de fundamentación técnica, mas realista.

## **5.2. Pérdidas por reemplazo de Harina de Carne y Hueso (HCH)**

Desde la aparición y prohibición subsiguiente de la HCH, la alimentación de rumiantes sufrió la necesidad de un cambio, que le sustrajo un producto de alto tenor proteico, de alta digestibilidad y bajo precio. No es fortuito que durante años, se postergase su prohibición y menos que se produjesen utilizaciones cruzadas, tanto en países atacados por BSE, como indemnes.

La HCH tiene una cantidad de N Total del orden 540 g/ por Kg de materia seca, de los cuales 257 g corresponden a proteína digestible en el intestino delgado del bovino. Es rica en Fósforo y Calcio, lo que la hace un complemento alimentario, difícil de sustituir, sobretudo para hacienda lechera. Estos parámetros están muy por arriba de materiales sustitutos de orden vegetal, como harinas de trigo, maíz o forraje verde. Por lo tanto su reemplazo crea un problema productivo, no fácil de resolver.

En el RU, es evidente que durante los años de aparición y previos a la BSE, las especies de cerdos y aves, estuvieron expuestas a la ingesta de Priones malignos, como los que afectaron al vacuno. Sin embargo considerando unas 170.000 TN de alimento consumido por los cerdos y unas 225.000 TN por los pollos, no se comprobó en el RU, ni en otros países importadores de HCH al RU, casos semejantes de enfermedades espongiiformes en ambas especies. Lo cual es un dato mas que indicativo de la real resistencia de los cerdos y aves. (63)

En la actualidad se están estudiando nuevas tecnologías que permiten inactivar los Priones resistentes, mediante alta temperaturas, hidrólisis alcalina de proteínas, y altas presiones, con el fin de poder utilizar la HCH como nutriente o combustibles de alto poder calórico ( 64).

## **5.3. Pérdidas por cierre de mercados comerciales**

Según los datos de FAO, para el año 2000, (65) el mercado mundial de carne bovina correspondió a un volumen dentro de 58, 7 millones de TN.

- Sud América con un población total bovina de 303 millones, produjo por 11.387.000 TN y exportó por 964.000 TN.

-Norte América con 109 millones de cabezas, produjo por 12.620.000 de TN y exportó por 1.486.000 TN.

-Europa con 146 millones de bovinos, produjo 12.173.000 TN y exportó 903.000 TN.

En el 2000, los precios fluctuaron para el Kilogramo de novillo a razón de: USA 2,52 U\$S, la UE 2,88 U\$S y Argentina 0,98 U\$S, con las correspondientes oscilaciones.

La aparición de la BSE en los mercados europeos, produjo un cambio fundamental de este panorama, tanto respecto del consumo, como de la oferta y de las seguridades exigidas por los mercados importadores, y por consiguientemente en los precios. Según el anuario de FAO del año 2000, los precios promedio de la carne bovina, habían bajado en la UE, por efectos de la BSE un 20%. El stock de intervención de UE, que en 1991 con más de 1.100.000 TN, hacían temblar al comercio mundial de carne, en el año 2000, no era mayor a 50.000 TN.

Es importante el caso de Canadá y de USA, ambos asociados en el sistema de sus producciones, no solo de animales, sino de sus productos y alimentos.

El tema de la BSE en Canadá, afectó no sólo a este país, como mercado exportador bovino, sino en sus relaciones comerciales con USA. Ambos países mantienen reglamentaciones para ellas respecto a condiciones de prohibición de uso de HCH y controles en la especie bovina, desde 1997. Sin embargo la aparición de casos de BSE en Alberta en 2003 y luego la aparición de una vaca importada en USA en 2004, creó un cambio paradigmático en la exportación de USA a terceros países, sobretodo a Japón como importante importador de carne bovina de alto precio y calidad.

Antes de la aparición en 2005 del caso de una vaca con BSE, se debatía en USA, la posibilidad de reabrir su mercado al país socio de Canadá, atendiendo las medidas precautorias tomada por Canadá desde la aparición de la BSE. En ese sentido el USDA y el Poder Ejecutivo, consideran la seriedad de las medidas técnicas adoptadas y aceptan reabrirlo, basados en principios científicos de control. Frente a ello, está la negativa del Congreso, por que representará retrasar el ingreso de las carnes americanas a Japón, que actualmente pide se cumpla el monitoreo de cada uno de los animales, antes de exportarle la carne.

Esto origina serias discusiones, que cuestan miles de millones de dólares para el consumo y menor precio para el productor. El problema no sólo repercute en los niveles para la exportación de USA, sino además en la competencia de terceros países involucrados en el comercio asiático, como Australia.

Como conclusión de esto, resulta que todos estos factores ponderables e imponderables son debidos a un caso de BSE, importado en USA desde Canadá en 2004 y la aparición de otro en el 2005. La magnitud de medidas que se obligarán a instrumentar para control y prevención, como la trazabilidad total y el diagnostico múltiple, representarán ingentes costos, muchísimo mayores que los causados por la enfermedad en sí misma.

Ello es una realidad para tener en cuenta por países como la Argentina, excepcionalmente ganaderos, privilegiados exportadores, con capacidad de proveer a cualquier mercado, ante los requisitos de la BSE.

Es importante tener en claro la privilegiada posición argentina para no despreciar oportunidades, y preocuparse para mantener las condiciones excepcionales de su producción ganadera. Para ello no hace falta más que seriedad en el mantenimiento y respeto por las normas, atención al cumplimiento de las medidas de prevención e inteligente posicionamiento en la lucha competitiva. Con el tiempo se irán aclarando las incógnitas que todavía presenta la BSE. Mientras tanto sepamos esperar, cumplamos los requisitos de precaución y no nos adelantemos a los tiempos.

## CONCLUSIONES

Luego de más de 20 años, desde la aparición de la BSE podemos definir diversos aspectos que caracterizan a esta TSE, quedando todavía muchos de ellos planteados en el campo de las hipótesis, y otros que estamos lejos de conocer en su intimidad.

1- Sabemos que la modificación isomórficas de la Proteína Priónica normal (PrPc) se transforma por algún mecanismo desconocido en PrPres (PrPbse), que se presenta como factor causal predominante en la generación de la enfermedad y en su transmisibilidad.

2- Sabemos que el Pr.Pbse, tiene cualidades destacadas para cruzar la barrera de las especies, pudiendo ser transmitido por inoculación y vía oral al ratón, oveja, cabra, cerdo, hámster, ciervos, felinos y que es altamente probable que sea el agente causal, en su paso por el hombre, de la variable de Creutzfeldt-Jakob (vCJD)

3- Sabemos que en su transmisión oral, la BSE se ha transmitido por la HCH, que fuera elaborada en su momento con restos de animales atacados, por el agente. También es altamente probable, incluso que esas HCH, estuviesen conectadas el agente del Scrapie, originando la enfermedad espongiiforme BSE, en su paso al bovino a través de la HCH.

4- Sabemos que las medidas adoptadas para controlar el uso de HCH de origen rumiante para su uso en rumiantes han sido exitosas en su aplicación en el RU. Las medidas en el resto de los países todavía no han podido corroborarse completamente, en razón que los tiempos de aplicación de las prohibiciones de uso HCH, caen todavía en los de la incubación de la enfermedad, que ocultan animales previamente infectados a las prohibiciones.. Sin embargo en el RU aparecen todavía animales enfermos, nacidos muy posteriormente a las medidas de prohibición y de control de HCH, no pudiendo adjudicarse a casos de contaminación cruzada, como ocurre todavía en varios países de Europa.

5- Estos casos, ponen en revisión las diversas teorías, sobre el origen de la enfermedad, por las que se trata de explicar causales y formas de contagio. Por ejemplo, se ha demostrado que si bien es de prevalencia baja, es posible la transmisión vertical de vacas infectados, pasando la BSE a algunas crías. Si bien no se han podido demostrar caracteres genéticos en el gen que codifica el PrP bovino, que afecten la susceptibilidad o resistencia, como es el caso en Scrapie o en CJD en el hombre, no se descarta cierto grado de relación genética con BSE, atendiendo y analizando su comportamiento epidemiológico. Un hecho sospechoso en este sentido, es las relativamente reducidas tasas de ataque de animales por establecimiento, a pesar de existir una gran dispersión geográfica de casos, derivados del consumo masivo de HCH contaminada.

6- No está descartado que en la BSE, la transformación del gen PrPc en PrPres,

sea un fenómeno, de mutación espontánea o idiopática, como es el caso de la CDJ esporádica en humano, donde aparece en el mundo a la tasa de 1:1.000.000 aproximadamente. La estructura Pr<sup>ionica</sup>, Pr<sup>Pbse</sup> demuestra una gran posibilidad para generar cepas mutantes en el campo de la química teórica, pero no aparece en la práctica la aparición de cepas diferenciables. En ciertos casos como Scrapie y CJD, se han demostrado la diversidad de mutantes, pero no en la BSE. No hay que descartar que la tecnología existente todavía no sea suficiente para definir la intimidad de estos procesos biológicos.

7. Mientras la BSE, subsiste como enfermedad de etiología compleja, por sus características de difícil control, con 100% de letalidad, aunque su incidencia, sea relativamente baja, su trascendencia en el comercio de productos animales potencialmente afectados, particularmente la carne, se mantendrá en el mundo con un alto grado de reacciones negativas, a la sola posibilidad de su ocurrencia .

8. Todo ello hace que la investigación y el control de esta enfermedad absorban ingente cantidad de recursos, más de los que justificaría la fría exposición de su deterioro real directo. Esto se origina en la incertidumbre epidemiológica, aun frente a la ocurrencia de un solo caso. Las modificaciones adoptadas en el año 2005 por la OIE, obligan a la caracterización de los países, evaluando su situación epidemiológica como de Riesgo Insignificante, Controlado e Indeterminado. Esto llevará a aplicar un régimen, que obliga a exhaustivos monitoreos en los países, del orden de cientos de miles en las poblaciones animales. Ello puede ser apropiado para descartar riesgos en países con la enfermedad, pero no se condice, en países como la Argentina, donde por sus características de explotaciones pecuarias, medidas de control y monitoreos realizados desde 1989 - que conllevan miles de animales controlados - se confirma sustentablemente, su indemnidad a la BSE.

9. A medida que las investigaciones avancen en hechos concretos que definan mas claramente las incógnitas actuales, se podrá ir modificando la estrictez de requisitos de control. Mientras tanto debe ser estricto pero diferente, el criterio de vigilancia y monitoreo, en los países que sufren la enfermedad, y en los que son indemnes. En estos es necesario mantener las medidas de precaución relacionadas con los factores de Riesgo, fundamentalmente las prohibiciones preventivas aplicadas a la HCH, pero sobre bases realistas y conducentes, adecuadas a la situación, que demostraron servir para su indemnidad durante años, como ha ocurrido en la Argentina.(70)

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Wells GAH., Scott AC., Johnson CT., Gunning RF., Hancock RD., Jeffrey M., Dawson M., & Bradley R.: A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. (1987). *Vet.Rec.* 135 (2), 40-41
2. Foster JD, Parnham D, Chong A, Goldm W. & Huntar N- Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. (2001) *Vet.Rec* 148, 165-171
3. Jeffrey M., Ryder SJ., Martin S., Hawkins SAC., Terry L., Berthelin-Baker C., & Bellworthy SJ.- Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1 Onset of distribution of disease specific PrP accumulation in brain and viscera. (2001) *J. comp.Pathology.* 124, 280-289
4. Wyatt JM., Pearson GR., Smerdon TN., Gruffydd-Jones TJ., Wells GAH., & Wilesmith JW. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in domestic cats. (1991) *Vet. Rec.* 129, 233-236
5. Kirkwood JK., & Cunningham AA., Epidemiological observation on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. (1994) *Vet. Rec.* 135, 296-303
6. Hartsough GR. & Burger D.: Encephalopathy in mink Epizootiologic and clinical observation( 1965) *Journal Infect. Diseases-* 115. 387-392
7. Hadlow WJ., & Karstad L.: Transmissible encephalopathy of mink in Ontario. (1968) *Can. Vet.J.* 9.193-195
8. Marsh RF., Bessen RA., Lehman S., & Hartsough GR. Epidemiological and Experimental studies on a new incident of transmissible mink encephalopathy (1991) *J. gen.Virol.* 72, 598-594.
9. Marsh RF., & Hadlow WJ. Transmissible mink encephalopathy- *Rev.sci. tech.Off. Int. Epiz.* (1992) 11.(2) 539-550
10. Hartung J., Zimmerman H., & Johannsen U. Infectious Encephalopathy in mink. Clinic-epidemiological and experimental studies (in German) *Mh. Vet. Med,* (1970) 25. 385-388
11. Danilov EP, Bukina NS., & Akulova BP.: Encephalopathy in mink (in Russian). (1974) *Krolikovod. Zverovod* - 17. 34
12. Williams ES., & Young S.; Spongiform encephalopathies in Cervidae- *Rev.sci.tech.Off.Int. Epiz.* (1992)- 11. (2) 551-567

13. Kellar JA., & Lees VW.- (Canadian Food Inspection Agency) Risk management in the transmissible spongiform encephalopathies in North America. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.* (2003) 22 (1) 201-225.
14. Narrod C., & Otte J.- Global trade in livestock, livestock products and by products. Abstracts of Joint WHO/FAO/OIE, technical Consultation on BSE: Public Health, Animal Health and Trade. Paris June 11-14, 2001. Pag.39.
15. Oesch B., Westaway D., Walcli M., McKinley MP., Kent SBH., Aebersold R., Barry RA., Tempst P., Peplow DB., Hood LE., Prusiner SB., & Wiassmann. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40. 735-746.
16. Bennet AD., Birkett CR., & Bostock CJ.- Molecular biology of scrapie - like agents. *Rev. Sci. tech. Of. Int. Epiz.* (1992) 11. (2) 569-603-
17. TurkE. Teplow D:B: Hood LE y Prusiner SB - Purificacation and properties of the cellular and scrapie prion proteins, *Eur.J- biochem* 1.988; 176. 21-30
18. Goldman W., Hunter N., Martin T. Dawson M., & hope J. Different forms of the bovine PrP. have 5 or 6 copies of short G-C-rich element in the protein-coding exon. *J- gen. Virol.* (1991) 72. 201- 204.
19. Vey M., Oilkuhn S., Willie H., Nixon R., Dearmand SJ., Smart EJ., Anderson RGW., Tarabolus A., & Prusiner SB. - Subcelullar localization of the cellular and scrapie prion protein in cavaolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA-* (1996) 93- 14.945-14.949
20. Prusiner SB., Scott M., Foster D., Pan KM., Groth D., Mirenda C., Torchia M., Yang SL., Serban D., Carlson GA., Hoppe PC., Westway, & D., Dearmnod SJ Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, (1990) 63- 673-686.
21. Scott MRD., Foster D., Mirenda C., Serban D., Coufal F., Walcii M., Torchia M., Groth D., Carson G., Dearmond SJ., Westway D. & Prusiner SB.- Transgenic mice expressing hamster prion produce especie-especie scrapie infectivity and amyloid plaque *Cell*, (1989) 59. 847-857
22. Kocisko DA., Come JH., Priola SA., Chesebro B. Raymond GJ. Landsbury PT., & Caughey B. *Nature* ( 1994) - 370. 471-474
23. Pan KM:, Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z:, Fletterik RJ., Cohen FE., & Prusiner SB. Conversion of alfa helices into beta sheet features in the formation of the crapie prion proteins. *Proc. Natl. Sci. USA.* (1993) -09. 10.962- 10.966.
24. Lasmezas Cl.. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz* (2003) - 22. (1)- 23-36

25. Jarrett JT., & Landsbury PT.- Seeding one-dimensional cristallization of amyloid - a pathogen mechanism in Alzheimer disease and scrapie. Cell- (1993) 73-1055-1058.
26. Bueler H.,Aguzzi A., SailerA., Geriner RA., Autenried P., Aguet M.& Weissmann C. - Mice devoid PrP are resistant to scrapie. Cell. (1993) 73- 1339-1347
27. Sailer A., Bueler H., Ficher M., Aguzzi A. Weissmann C,- No propagation of Prions in mice devoid of PrP. Cell, (1994) 77- 967-968.
28. Kimberlin RH.,& Walker CA- Patogenesis of mouse scrapie dynamics of agent of replication in spleen, spinal cord and brain after infection by different routes-J.comp.Pathology (1979) - 89. 551-562.
29. Parchi P.,Castellani R.,Capellari S., Ghetti B., Young K., Chen SG.,Farlow M.,Dickson DW., Sima AAF. Trojanowski JQ., Petersen RB., & Gambetti ).- Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jacob disease. Annals Nuerology, ( 1996) 39. 767-778
30. Safar JG.. Wille H., Itri V., Groth D., Serban H., Torchia M., Cohen FE., & Prusiner SB.- Eight prion strain have PrPsc molecules with different conformations. Nature Med. (1998) 4. - 1157-1163
31. Wells GAH., Hawkins SAC., Green RB.,Austin AR., Dexter I., Spencer YI, Chapin MJ., Stak MJ, & Dawson M. - Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE) an update. Vet Rec. (1998) 142. 103-106.
32. European Commission. Update of the opinion of the BSE infectivity.Scientific Stering Committee( SSC).  
www: Europa.eu.int/comm/food/fs/sc/outcome\_en.html. (18 February 2003)
33. Mencionado por JA Bailey de DEFRA( Department for Environment Food, and Rural Affairs.) - London- UK
34. Prusiner SB., Telling G., Cohen FE.,& DeArmond SJ.- Prion diseases of human and animals. Semin Virol. (1996). 7. 159-173
35. United Kingdom Spongiform Encephalopathy Advisory Committee (1995) Present knowledge and research on BSE. Publication Centr. London. 99 p.
36. Hernandez-Sanchez J. Waddington D.,Wiener P., Haley CS. & Williams JL. Genome wide search for markers associated with bovine spongiform encephalopathy. Mammalian Genome - (2002) 20. 164-168)
37. Dickinson AG.,& Outram GW.: Genetic aspects of unconventional virus infection: the basis of virinos hypotesis, in novel infectious agents and the central

nervios system. G. Books and J Marsh (Eds. Wilay Interscience. Chescherter. 63-83)

38. Detwiler LA., & Baylis M. The epidemiology of scrapie. Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz. (2003) 22. (1) 121.-143.

39. Foster JD., Parnham D., Chong A., Goldmann W. & Hunter N. Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. Vet. Rec. (2001) 148. 165-171.

40. Jeffrey M., Ryder SJ., Martin S., Hawkins SAC., Terry L., Berthelin-Baker C., & Bellworthy SJ. Oral inoculation of sheep with the agent of BSE. 1 Onset and distribution of disease, specific accumulation in brain and viscerae. J. comp. Pathol. (2001) 124. 280-289.

41. Foster JD., Mc Kelvey WA., Mylne MJ., Williams A., Hunter N., Hope J., & Frase H. - Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryos transfer. Vet Rec. (1992) 130. 341-343

42. Foster JD., Hunter N. Williams A., Mylne M. Mc Kelvey WA., Hope J., Frase H & Bostock C. - Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. Vet Rec. (1996) 138. 559-562

43. Foote WC., Clark W., Macius a., Call WJ., Hourrigan J., Evans RC., Marshall MR., & de Camps M. - Prevention of scrapie transmission, using embryo transfer. Am. J. vet. Res. (1993) 34. (11) 1863-1868

44. Wilesmith JW., Wells GA., Ryan JB., Gavier-Widen D., & Simmons MM.- A cohort study to examine maternally- associated risk factor for bovine spongiform encephalopathy. Vet. Rec. (1997) 141. 239-243.

45. Brotherson JG., Renwick CC., Stamp JT., Zlotnik I. & Pattison IH., - Spread of scrapie by contact to goat and sheep. - J. comp. Pathol (1968) 78. 9-17

46. Dickinson AG., Stamp JT., & Renwick CC. Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. J. comp. Pathol. (1974) 84. 19-25

47. Hourrigan J, Klingsporn A., Clark WW., & de Camps M- Epidemiology of scrapie in the United States in slow transmissible disease of nervous system, (1979) Vol 1. SB Prusiner & JW Hadlow - eds. Academic Press. New York 331-356.

48. Hadlow WJ., Eklund CM., Kennedy RC., Jackson TA., Whitford HW., & Boyle CC. Course of experimental scrapie infection in goats. J. Infect Dis. (1974) 129- , 559-567.

49. Hadlow WJ., Kennedy RC., & Race- Natural infection of Suffolk sheep with scrapie J. Infect. Dis. (1982) 146. 657- 664.

50. Pattison IH., & Millson GC. - Experimental transmission of scrapie in sheep and goat by the oral route. *J. comp. Pathol.*(1961) 71. (2) 171
51. Androletti O. Lacroux c., Chabert A., Monnereau I., Tabouret G., Lantier F., Berthon P., Eychenne F., Lafond-Benestad S., Elsen JM. & Schelser F. PrPsc accumulation on placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of fetal Prp genotype and effect on ewe -to-lamb transmission. *J. gen. Virol.* (2002) 83. 2607- 2616
52. Palsson PA.- Rida (scrapie) in Iceland and its epidemiology in slow transmission disease of the nervous system ( S.B. Prusiner & WJ: Hadlow eds. *Academic Press. Vol 1. New York 357-366*
53. Sigurdarson S. - Epidemiology of scrapie in Iceland and experience with control measures in sub-acute spongiform encephalopathies. - R. Bradley, M Savey & B. Marchant Eds. - *Kluwer Academic Publishers Boston. (1991) 253-242-*
54. Safar JL., Scoo M., Monogham J., Deering C., Didorenko S., Vergara J., Ball H., Leclerc E., Solforosi L., Serban H., Groth D., Button DR., Prusiner SB., & Williamson RA- Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nature Biotechnology* ( 2002).20. 1147-1150.
55. Foster JD., Hope J., & Frase H. - Transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy to sheep and goat.- *Vet. Rec.* ( 1993) 133. 339- 341.
56. Chapman J. Brown P., Rabey JM., Goldfarb JG., Inzelberg R., Gibbs CJ., Gajdusek DC., & Korczyn AD., Transmission of spongiform encephalopathy from family Creutzfeldt-Jacob disease patient of Jewish Lybian origin carrying the PRNP codon 200 mutation. *Neurology* ( 1992) 42. 1240-1250
57. Zeidler M., Stewart G., Cousens SN., Estibeiro K., Will RG.- Codon 129 genotype and new variant CJD.- *The Lancet* (1997) Vol.350. Pg. 668.
58. WHO Manual for Strengthening Diagnosis and Surveillance of Creutzfeldt-Jacob Disease. - (1998) WHO/EMC/ZDI/ 98.11- Geneva.
59. Shaked GM., Shaked Y., Kariva Z., Halimi M., Avraham I., & Gabizon R. *J. biol. chem.* (2001), 276. 31.479- 31.482.
60. Collinge J., Sidle KCL., Meads J., Ironside J., & Hill AF., - Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of "new variant" CJD- *Nature* ( 1996) Vol. 383. 685-690.
61. Heim D., & Kihm U- Risk management of transmissible spongiform encephalopathies in Europe. *Rev. Sci. tech. Int. Epiz.* (2003) 22 (1). 179-199.

62. Prince MJ., Bailey JA., Barrowman PR., Bishop KJ., Campbell GR., & Wood JM. - Bovine spongiform encephalopathy- Rev. Sci. tech. Int. Epiz. (2003) 22 (1) 37-60.
63. Matthews D., & Cooke BC. - The potential for transmissible spongiform encephalopathies in non ruminant livestock. Rev. Sci. tech. Int. Epiz. (2003) 22 (1) 283-298
64. Taylor DM. & Woodgate SL- Rendering practices and inactivation of transmissible spongiform encephalopathy agents. Rev. Sci. tech. Int. Epiz. (2003) 22 (1) 297- 310.
65. Fao. World Livestock Production. 2003. [Http:// www.fao.org.WAICENT/FAOINFO7ECONOMICS/ESS/chart/geografical/img.mondo](http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO7ECONOMICS/ESS/chart/geografical/img.mondo). 31/03/03
66. Green AJ., Jackman R., Marshall TA., & Thompson EJ. Increased S 100 b in the cerebrospinal fluid of some cattle with bovine spongiform encephalopathy. Vet Rec. (1999) 145, 107-109
67. Jackman R., & Everest SJ., - Further development of the electrochemical analysis of urine from cows with BSE. Consultation on BSE with de SVC of the Commission of the European Communities . Brussels. 14-15 September 1993. Document. VI/4131/ 94 EN.
68. Schreuder BEC. Somerville RA. Bovine spongiform encephalopathy in sheep ? Rev. tech. Off, Int, Epiz. (2003) (22) (1) 103-120
69. Wells, G.H, J. Spiropoulos, S.A., Hawkins, and S.J. Ryder, The Veterinary record, March 26, 2005, 401-407)
70. 1991 - B. Cané, E. Gimeno; J.C. Manetti; C. Van Gelderen; E. Ulloa and A.A. Schudel. "Analysis of BSE Risk Factors in Argentina". ISBN 950985321-b 28 págs. English Version. Special Report. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación SENASA-INTA.
71. 1998- "BSE Risk Factors in Argentina", Schudel A.A., Barcos L.O., van Gelderen C., Edited by SAGPyA-SENASA Consulting Technical Committee on TSE, ISBN 987-96849-0-7, (1-77)
72. 1998- "Scrapie Risk Ractors in Argentina", Schudel A..A., Alvarez, C., Closs, P., Kistermann, J.C., Leanes, F., Blanco Viera, J., Carrillo, B.J., Weber, L.. Edited by SAGPyA Technical Consulting Comittee on TSE, ISBN 987-96849-1-5 (1-66)
73. 1999-"Argentine Scientific Advisory Committee on Bovine Spongiform Encephalopathies (2nd. meeting)" Ed. L.O.Barcos, C.vanGelderen y A.A.Schudel, April 21-24, 1998, El Calafate, Argentina, SAGPyA-SENASA-INTA, ISBN 987-9184-06-8