

LA VIGILANCIA ACTIVA Y PASIVA DE LA ENCEFALOPATÍA ESPONGIFORME BOVINA EN CUBA

R. Bolaños Escofet*, N. Rodríguez, Dalia Rodríguez**, C. Delgado*, Yolanda Capdevila*,
Ma. Antonia Abeledo*****

**Instituto de Medicina Veterinaria. Servicio Veterinario de Frontera. Calle 12 No. 355 e/ 15 y 17,
Vedado CP 10 400, La Habana, Cuba. Correo electrónico: rbescofet@infomed.sld.cu;*

***Centro Nacional de Epizootiología, Diagnóstico e Investigaciones (CENEDI). Avenida 51
No. 33 222, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Cuba; ***Centro Nacional de Sanidad
Agropecuaria (CENSA). Autopista Nacional y Carretera de Jamaica. Apartado 10 CP 32700,
San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba*

RESUMEN: En el presente estudio se caracterizó la población bovina de Cuba mayor de 24 meses de edad, considerada la de mayor riesgo de contraer la encefalopatía espongiiforme bovina, y se muestran los resultados del programa de vigilancia activa y pasiva de la enfermedad durante el período 2001-2008. Los resultados mostraron que en Cuba el 60,5 % de la población bovina total se encuentra en edad de riesgo, se investigaron casos de encéfalos bovinos pertenecientes a ambos tipos de vigilancia y que el 88,7 % del total de casos investigados corresponden al total de reportes de notificación al Sistema de Vigilancia Epidemiológica del Instituto de Medicina Veterinaria bajo sospecha clínica de trastornos nerviosos, lo que conlleva a plantear que en el país se está realizando una mayor vigilancia de la enfermedad. La subpoblación bovina de riesgo de más casos investigados fue la procedente de bovinos bajo sospecha de trastornos nerviosos (vigilancia pasiva) y se considera que ambos tipos de vigilancia son importantes, por lo que se llevan de manera simultánea. A partir de la realización del diagnóstico diferencial de la enfermedad y la emisión del diagnóstico confirmativo se determinan 11 causas fundamentales, siendo las principales por hemoparasitosis, desnutrición e intoxicaciones. Todos los casos investigados según el tipo de vigilancia resultaron negativos a la enfermedad, al observarse ausencia de lesiones compatibles. Se demuestra que no hay evidencia de la enfermedad en el país.

(Palabras clave: EEB; vigilancia de EEB; Cuba; vigilancia activa y pasiva; riesgo)

ACTIVE AND PASSIVE SURVEILLANCE OF THE BOVINE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHY IN CUBA

ABSTRACT: In the present study, the bovine population over 24 months of age in Cuba was characterized. It is considered the one with the highest risk to contract bovine spongiform encephalopathy. The results of the disease active and passive surveillance program from 2001 to 2008 are also shown. The results showed that the 60.5 % of the total bovine population in Cuba is in the age of risk. Bovines brains cases belonging to both types of surveillance active and passive were researched, and 88,7% of the total corresponds to the total amount of reports notified to the Epidemiological Surveillance System at the Veterinary Medicine Institute under clinic suspicion of nervous disorders. It shows that a more effective surveillance towards the disease is being carried out in the country. Bovine subpopulation of risk in most of the cases researched was that under suspicion of nervous disorders (passive surveillance); thus, both types of surveillance are important and are carried out simultaneously. From the disease differential diagnostic; the 11 main causes were determined, being the main ones by hemoparasites, malnutrition and intoxications. All the cases researched, depending on the type of surveillance were negative to the disease, according to the absence of compatible injuries. Therefore, it is demonstrated that there is no evidence of the disease in the country.

(Key words: BSE; surveillance BSE; Cuba; active and passive surveillance; risk)

INTRODUCCIÓN

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB) es una enfermedad neurológica, degenerativa y mortal de los bovinos, reconocida y definida por primera vez en el Reino Unido en noviembre de 1986, por examen histopatológico de cerebro de bovino afectado (1,2).

Es considerada como una de las enfermedades emergentes más importantes que ha surgido en el planeta (3), que no solo ha afectado a la región Europea (4), sino también a Asia (5), Medio Oriente y América del Norte (6,7,8,9). Ha ocasionado un impacto significativo en la salud de los animales y al hombre, con una alarma y repercusión a nivel social, sanitario y político-económico, conociéndose como la mayor crisis alimentaria de la historia.

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), le recomienda a todos sus países miembros que esclarezcan la situación de la EEB en sus poblaciones de ganado bovino (10). Las recomendaciones sobre el riesgo de EEB asociado a la población bovina de un país deben ser determinadas en función de una evaluación del riesgo y teniendo en cuenta una serie de criterios que aparecen descritos en el Capítulo 11.6, Artículo 11.6.22 sobre actividades de vigilancia epidemiológica de la EEB del Código Sanitario para Animales Terrestres, 2008 (11).

El Instituto de Medicina Veterinaria (IMV), por disposición legal en el Decreto Ley Número 137 de la Medicina Veterinaria de fecha 19 de abril de 1993, y por su condición de institución rectora de la Sanidad Animal en Cuba, ha puesto en vigor en el territorio nacional, un conjunto de regulaciones sanitarias en materia de EEB. Estas se iniciaron con la implementación de la Resolución No. 6 de fecha 19 de agosto de 1996, referente al establecimiento de regulaciones estrictas en el campo de las importaciones, en la actividad del sistema de vigilancia de la enfermedad y prohibición de la alimentación de rumiantes con harinas de carne y huesos derivados de la propia especie y su utilización como fertilizantes en la agricultura; así como su actualización en otras posteriores resoluciones, quedando vigente la Resolución No. 7 de fecha 25 de marzo de 2010.

El programa de vigilancia activa y pasiva de la EEB se implementa en Cuba en el mes de noviembre del año 2002, con su generalización en las 14 provincias del país y el Municipio Especial Isla de la Juventud; este es aplicado a todos los bovinos del país mayores de 24 meses de edad y a las ovino-caprinas. También es obligatorio en las poblaciones de rumiantes introducidas al país bajo cumplimiento de los procedimientos

establecidos por el Servicio Veterinario de Frontera del IMV (12,13,14).

La necesidad de disponer de un programa de vigilancia activa y pasiva de la EEB en el país se fundamenta en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), como única posibilidad de limitar la difusión de la enfermedad y de reducir el riesgo de transmisión al humano y dando cumplimiento a los lineamientos generales de la OIE.

En el presente estudio se pretende caracterizar a la población bovina de riesgo del país y mostrar los resultados nacionales alcanzados en la vigilancia activa y pasiva de la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se caracterizó la población bovina del país y la población considerada como de riesgo de EEB mayor de 24 meses de edad, utilizando como fuente oficial de información la disponible hasta enero de 2009 en la base de datos del Sistema de Registro Pecuario (SISREGP) del Centro Nacional de Control Pecuario (CENCOP) del Ministerio de la Agricultura (MINAG). Se consideró a esta población bovina como de mayor riesgo, por ser este el rango de edad conocido de mayor susceptibilidad a la enfermedad y donde se ha demostrado que hay más probabilidades de detectar la presencia de la misma en torno a una prevalencia ya estimada de al menos un caso por 100 000 animales y con un nivel de confiabilidad del 95 % (11). Se emplea el término de edad mayor de 24 meses porque en la base de datos del CENCOP se trabaja con ese rango de edad.

Para los propósitos de la vigilancia activa y pasiva de la enfermedad en el país se tuvieron en cuenta las definiciones siguientes:

Vigilancia activa: Encaminada a la búsqueda efectiva de la enfermedad, mediante el control de determinadas poblaciones de los animales de consumo y de riesgo (13,14). En este tipo de vigilancia se tuvo en cuenta a los bovinos bajo sacrificio de emergencia, bovinos caídos y bovinos bajo sacrificio de rutina (15).

Vigilancia Pasiva: Encaminada a la búsqueda efectiva de la enfermedad, mediante la investigación de encéfalos de animales que han sido notificados con sintomatología nerviosa a través del Sistema de Vigilancia Epizootiológica (SIVE) del IMV (13,14).

El presente estudio evalúa el período comprendido entre los años 2001 al 2008. Se estudió por años el número de reportes enviados por todas las direcciones provinciales del IMV bajo sospecha clínica de trastor-

nos nerviosos en bovinos y que son reportados a través del bloque 7 de enfermedades nerviosas, establecido por el SIVE para ese fin (13,14). Todas las notificaciones se relacionaron por años con el número de encéfalos investigados en el país según el tipo de vigilancia, utilizando como fuente oficial de información la base de datos de vigilancia de la EEB del Departamento Nacional de los Servicios Veterinario de Frontera (SVF).

El proceso de remisión de las muestras de encéfalos al Centro Nacional de Epidemiología, Diagnóstico e Investigación (CENEDI), los tres laboratorios territoriales: Holguín, Camagüey y Villa Clara y los restantes laboratorios provinciales del IMV, se efectuó cumpliendo con el modelo establecido y el esquema de envío de muestras al laboratorio e interpretación de los resultados (14).

Para el diagnóstico de la EEB se empleó la técnica histopatológica según el protocolo para la realización de la técnica de inclusión y corte en parafina y coloración de hematoxilina-eosina establecida en las normas NRAG 753/ 1985 y NRAG 863/ 1988 para los laboratorios de diagnóstico de la red nacional del IMV y la técnica de inmunohistoquímica según las descripciones generales del Bovine Spongiform Encephalopathy Antigen Test kit, Immunohistochemistry VMRD, Inc.; con el uso del anticuerpo monoclonal F99/97.6.1 para detectar por inmunohistoquímica la proteína priónica (PrP) en muestras de cerebro bovino.

Se evaluaron los resultados oficiales emitidos por cada centro de la red diagnóstica nacional del IMV con el empleo de ambas técnicas diagnósticas, así como el diagnóstico diferencial de la enfermedad con el listado de algunas enfermedades que hay que tener en

cuenta para el mismo, según el Manual para la vigilancia activa y pasiva de la enfermedad en Cuba (13,14).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La población total bovina de riesgo del país la componen 2 316.776 cabezas de ganado, de ellas el 52,7 % corresponden a la categoría de vacas, el 26,4 % a la de novillas, el 13,0 % a la de bueyes, el 6,7 % a la de toros de ceba y el 1,2 % a la de sementales. El 79,0 % son hembras y el 21,0 % son machos (Tabla1).

Al comparar la cantidad de cabezas de ganado consideradas como de riesgo en el país con el total de la población bovina nacional, podemos decir que en Cuba el 60.5 % de la población bovina total se encuentra en edad de riesgo de poder contraer la enfermedad.

Los reportes a través del bloque 7 de enfermedades en bovinos que cursan con sintomatología nerviosa, han permitido evaluar el programa de vigilancia en las 14 provincias del país y el Municipio Especial Isla de la Juventud, al poderse comparar por años todos los reportes efectuados con el número de encéfalos remitidos e investigados en los diferentes laboratorios de la red diagnóstica nacional.

En el período evaluado se registraron por el SIVE del IMV un total de 1283 reportes de notificación de bovinos bajo sospecha clínica de trastornos nerviosos (Figura 1). Consideramos que el incremento en el año 2004 se deba al cumplimiento de los objetivos en los talleres territoriales de capacitación sobre EEB organizados a inicios de ese año y donde se resalta la necesidad y la importancia de la vigilancia de la enfermedad en todo el territorio nacional. La estabilidad de reportes de notificación en los restantes años se logra

TABLA 1. Población bovina nacional y total de bovinos mayores de 24 meses de edad./ *Total and over 24 months old population cattle*

Bovinos machos mayores de 24 meses de edad	Cantidad/ cabezas de ganado	%
Toros de ceba	156 238	6.7
Bueyes	300 707	13.0
Sementales	28 684	1.2
TOTAL	485 629	21.0
Bovinos hembras mayores de 24 meses de edad		
Novillas	611 063	26.4
Vacas	1 220 084	52.7
TOTAL	1 831 147	79.0
Total de bovinos machos y hembras mayores de 24 meses de edad	2 316 776	60.5
Población bovina Nacional	3 831 227	

Fuente Oficial: Sistema de Registro Pecuario (SISREGP) del Centro Nacional de Control Pecuario (CENCOP) del MINAG. Información disponible hasta enero 2009

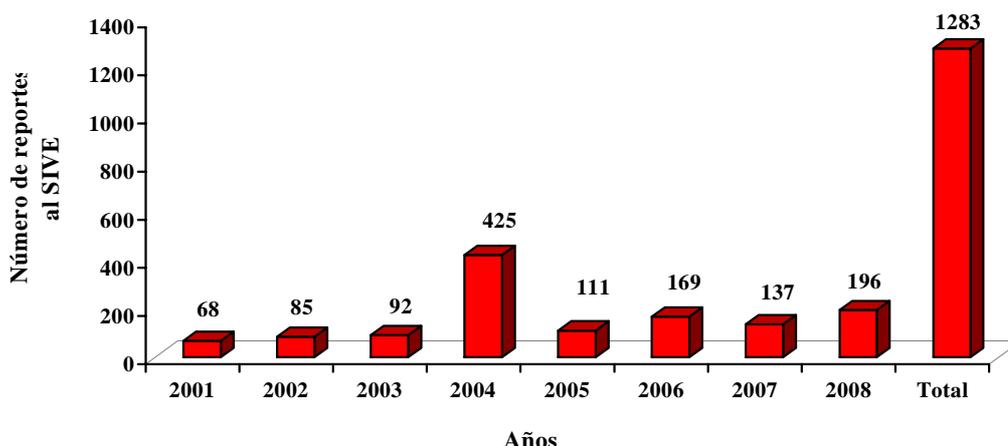


FIGURA 1. Reportes de notificación al SIVE bajo sospecha clínica de trastornos nerviosos. Período 2001-2008./ *Reports to the surveillance system with clinical suspicion of nerve disorders. Period 2001-2008.*

Fuente Oficial: Base de datos SIVE del IMV. Bloque 7 de enfermedades que cursan con síntomas nerviosos y que hay que tener en cuenta en el diagnóstico diferencial de la EEB

al ponerse en marcha un programa continuo de concientización de la EEB dirigido a ganaderos, productores y veterinarios como recurso esencial para la detección y notificación de la misma.

La Figura 2 muestra el número de encéfalos de bovinos investigados por la red diagnóstica nacional del IMV según el tipo de vigilancia, durante el período 2001-2008. En el caso de la vigilancia pasiva (bovinos bajo sospecha clínica de trastornos nerviosos) se estudiaron 1138 encéfalos y en la vigilancia activa (bovinos aparentemente sanos sacrificados) 879, para un total de 2017 encéfalos investigados.

Se conoce que la vigilancia pasiva es aplicada para ser efectiva cuando la enfermedad no es altamente contagiosa, tenga un corto período de incubación y los síntomas clínicos son fáciles de reconocer (16,17). Estas características no son encontradas en el caso de la EEB, donde normalmente un solo animal por rebaño es afectado y el período de incubación tiene un promedio mayor de los 5 años. La calidad de este sistema de vigilancia pasiva difiere de un país a otro y el resultado no es fácil poderlo comparar (4).

Basadas en esas experiencias es que la Unión Europea introdujo la vigilancia activa en el año 2001

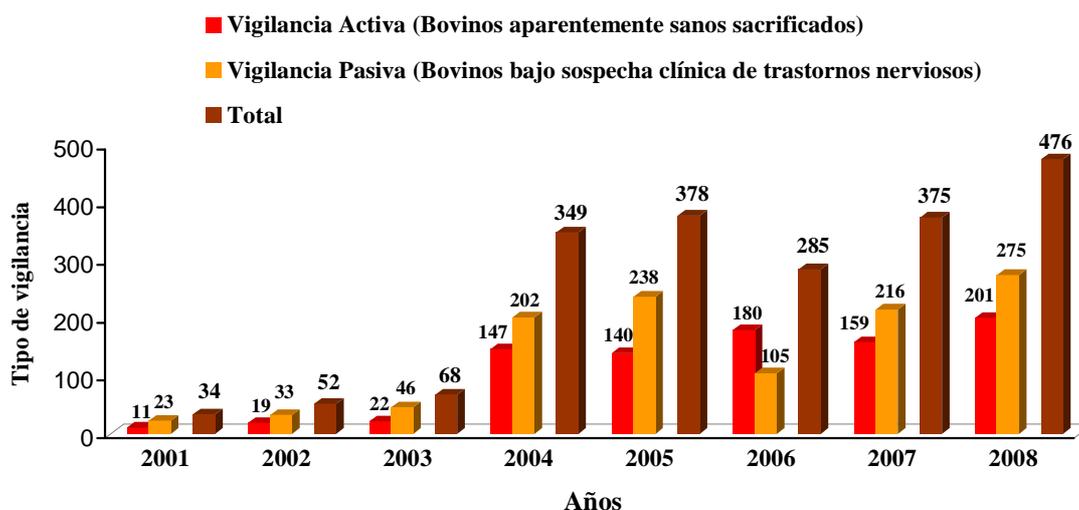


FIGURA 2. Número de encéfalos investigados según el tipo de vigilancia. Período 2001-2008./ *Brains researched according to the surveillance type. Period 2001-2008.*

Fuente Oficial: Base de datos SVF del IMV.

en las poblaciones de riesgo de EEB y la extendió hacia todo el ganado destinado al sacrificio de rutina mayor de 30 meses de edad. A partir de la introducción de la vigilancia activa, países que habían declarado por años no tener casos de EEB detectaron sus primeros casos (4).

Dos hallazgos importantes en nuestros resultados es que se investigaron casos de encéfalos bovinos pertenecientes a ambos tipos de vigilancia y que el 88,7% del total de casos investigados corresponden al total de reportes de notificación al SIVE bajo sospecha clínica de trastornos nerviosos, lo que evidencia que se está realizando en el país una mayor vigilancia de la enfermedad.

Por tal motivo, consideramos que en nuestro programa ambos tipos de vigilancia son importantes, por lo que son llevados de manera simultánea.

En el programa de vigilancia de la enfermedad en el país fueron identificadas varias subpoblaciones bovinas, teniendo en cuenta la información científica consultada (4,18) y de acuerdo con los niveles de prevalencia conocidos del agente causante de la enfermedad (11).

La Figura 3 muestra la clasificación de esas subpoblaciones bovinas del país, teniendo en cuenta las 2017 muestras de encéfalo remitidas e investigadas en los laboratorios de la red diagnóstica nacional del IMV. Como se puede observar la subpoblación bovina de riesgo de mayores casos investigados fue la procedente de bovinos bajo sospecha de trastornos nerviosos, seguidas de las de bovinos con sacrificio de rutina, la de bovinos importados aparentemente sanos sacrificados y por último bovinos con sacrificio de emergencia (incluido los caídos).

No se identificaron casos investigados procedentes de la subpoblación de riesgo de bovinos muertos. Esta subpoblación se refiere a los bovinos hallados muertos en la unidad, en mataderos o durante la transportación y se describe por la OIE por tener un tercer nivel de prevalencia (11). Consideramos que la principal causa de la no identificación de esta subpoblación bovina en el período evaluado es debida a que los animales fallecidos una vez detectados presentaban un proceso avanzado de autólisis, siendo rechazados para ser muestreados.

Sin embargo de las 4 subpoblaciones bovinas de riesgo investigadas la que más valor le aporta a los resultados del programa de vigilancia es la referida a los bovinos bajo sospecha de trastornos nerviosos ya que es descrita por la OIE por tener el nivel de prevalencia más alta (11).

El método diagnóstico histopatológico basado en la detección histológica de lesiones típicas de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) en el tejido del Sistema Nervioso Central (SNC) y dentro de ellas se lista a la EEB, es considerado como el de referencia para confirmar un diagnóstico clínico de la enfermedad. Ha sido considerado también como muy específico por la observación directa de las lesiones espongiformes sistémicas y notorias por sus cambios neurodegenerativos, consistiendo en astrogliosis, vacuolización intracelular, pérdida de neuronas y formación de placas amiloides ocasionales. Sin embargo se conoce que es menos sensible que otras técnicas (19,20) y esta sensibilidad puede incrementarse por las técnicas de inmunohistoquímica, al usar anticuerpos monoclonales específicos para la proteína priónica anormal PrP^{Sc} (18).

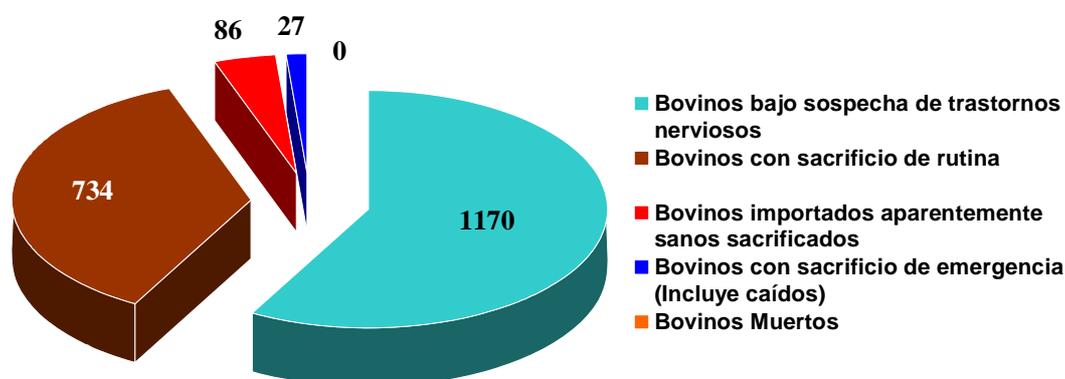


FIGURA 3. Subpoblaciones bovinas de riesgo investigadas según el tipo de vigilancia. Período 2001-2008/. *Risk cattle subpopulations researched according to the surveillance type. Period 2001-2008.*

Fuente Oficial: Base de datos SVF del IMV.

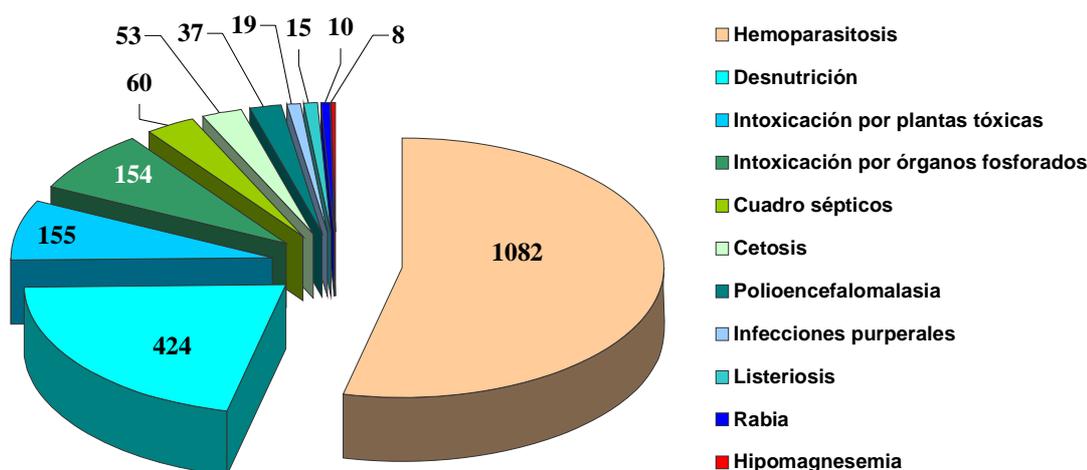


FIGURA 4. Diagnóstico confirmativo emitido por la red diagnóstica nacional. Período 2001-2008./ *Confirmatory diagnosis issued by the national diagnostic network. Period 2001-2008.*

Fuente Oficial: Base de datos SVF del IMV.

Experiencias de aplicación de métodos rápidos de diagnóstico de EEB en comparación con los métodos de referencia han sido descritas en múltiples trabajos, así como la evaluación de su sensibilidad y especificidad. En Polonia la detección de los tres primeros casos de EEB fueron basados en estos métodos rápidos con resultados positivos (21).

Partiendo de lo anteriormente expuesto, podemos plantear que en Cuba se iniciaron las primeras investigaciones de las muestras de encéfalo para EEB, con el empleo de la técnica histopatológica, disponible hasta ese momento en todos los laboratorios de la red diagnóstica nacional del IMV. A finales del año 2004 fue posible introducir en el país la técnica de inmunohistoquímica y en la actualidad el país cuenta con dos métodos diagnósticos diferentes para poder incrementar la sensibilidad en el diagnóstico.

Todas las muestras de encéfalos pertenecientes a los 2017 bovinos del país evaluadas por el programa de vigilancia activa y pasiva de la EEB durante el período 2001-2008, fueron investigadas con el empleo de ambos métodos diagnósticos según el tipo de vigilancia, resultando todas negativas a la enfermedad al observarse ausencia de lesiones compatibles.

Los resultados negativos por no observación de reacción inmunohistoquímica obtenidos en las muestras investigadas con el uso de la técnica de inmunohistoquímica es fundamentado por la efectividad del anticuerpo monoclonal F99/97.6.1 y su reacción con el epítopo de la proteína de rumiantes (22).

Con la realización del diagnóstico diferencial de la EEB y la emisión oficial del diagnóstico confirmativo de los 2017 bovinos investigados se determinaron 11 causas fundamentales, siendo las principales por hemoparasitosis, desnutrición e intoxicaciones por plantas tóxicas y órganos fosforados (Figura 4).

Los resultados de este trabajo nos permiten concluir que no existe evidencia de la encefalopatía espongiiforme bovina en el país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el trabajo desempeñado por los especialistas provinciales de los SVF del país, como máximos responsables de la ejecución del programa de vigilancia activa y pasiva de la EEB en cada dirección del IMV, a los especialistas de Anatomía Patológica y Virología de los laboratorios provinciales y territoriales y a los especialistas de vigilancia y epidemiología de las direcciones provinciales y municipales del IMV, por constituir todos un equipo de trabajo multidisciplinario.

REFERENCIAS

1. Wells GAH, Scout AC, Jonson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, et al. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec.* 1987; 121:419-20.

2. Wells GAH, Wells M. Neuropil vacuolation in brain: a reproducible histological processing artifact. *J Comp Pathol.* 1989; 101:355-62.
3. Spickler AR, Roth JA. Emerging and Exotic Diseases of Animals. Institute for International Cooperation in Animals Biologics. Iowa State University College of Veterinary Medicine: Ames-Iowa; 2003. p.1-12.
4. Ducrot C, Arnold M, Koeijer de A, Heim D, Calavas D. Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet Res.* 2008; 39(15):1-18.
5. Gilles J. Mad cow disease comes to Japan. *Nature.* 2001; 413(240).
6. Cox LA, Popken DA, VanSickle JJ, Sahu R. Optimal Tracking and Testing of U.S. and Canadian Herds for BSE: A Value-of-Information (VOI) Approach. *Risk Anal.* 2005; 25(4):827-40.
7. Donnelly CA. Bovine spongiform encephalopathy in United States an epidemiologist's view. *N Engl J Med.* 2004; 350(6):1533-44.
8. Lewis RE, Tyshenko MG. The impact of social amplification and attenuation of risk and the public reaction to mad cow disease in *Canada*. *Risk Anal.* 2009; 29(5):714-28.
9. Richt JA, Kunkle RA, Nicholson EM, Hamir AN, Czub S, Kluge J, et al. Identification and characterization of two bovine spongiform encephalopathy cases diagnosed in the United States. *J Vet Diagn Invest.* 2007; 19:142-54.
10. Morley RS; Chen S, Rheault N. Assessment of the risk factors related to bovine spongiform encephalopathy. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2003; 22(1): 157-78.
11. Organización Mundial de Sanidad animal (OIE). Código Sanitario para los Animales Terrestres. Capítulo 11.6 Artículo 11.6.22 sobre actividades de vigilancia epidemiológica de la encefalopatía espongiforme bovina. 2008. Disponible desde: http://www.oie.int/esp/normes/mcode/es_chapitre_1.11.6.htm (Fecha de consulta: 30 de agosto de 2009).
12. Bolaños R, Rodríguez N, Delgado C, Urquiaga R. Instructivo para la toma y remisión de muestras para Encefalopatía Espongiforme Bovina (Diagnóstico Histopatológico). Instituto de Medicina Veterinaria. 2002. p. 1-9.
13. Bolaños R, Rodríguez N, Delgado C, Urquiaga R. Procedimiento para la toma y remisión de muestras y el diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico de la EEB. Instituto de Medicina Veterinaria. 2006. p.1-17.
14. Bolaños R, Rodríguez N, Delgado C, Urquiaga R. Manual para la vigilancia activa y pasiva de la Encefalopatía Espongiforme en Cuba. Procedimiento para la toma y remisión de muestras al laboratorio para su diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico. Instituto de Medicina Veterinaria. 2008. p.1-22.
15. Supervie V, Costagliola D. BSE Risk Assessment as a Basis for Updating French Screening Policy. *Risk Analysis.* 2007; 27(5):1131-40.
16. Doherr MG, Oesch B, Moser M, Vandeveld M, Heim D. Targeted surveillance for bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec.* 1999; 145:672.
17. Doherr MG, Audigé L. Monitoring and surveillance for rare health-related events: a review from the veterinary perspective. *Philos Trans R Soc Lond Biol Sci.* 2001; 356:1097-1106.
18. Supervie V, Costagliola D. BSE Risk Assessment as a Basis for Updating French Screening Policy. *Risk Analysis.* 2007; 27(5):1131-40.
19. Gavier-Widen D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest.* 2005; 17:509-27.
20. Wells GA, Wilesmith JW. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 1995; 5:91-103.
21. Polak MP, Larska M, Rozek W, Zmudzinski JF. Usefulness of rapid test for diagnosis of BSE. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2003; 47:89-93.
22. O'Rourke KI, Baszler TV, Besser TE, Miller JM, Cutlip RC, Wells GAH, et al. Preclinical diagnosis of scrapie for immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3254-59.

(Recibido 21-1-2011; Aceptado 20-05-11)