



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCION DE PROTEINAS PRIONICAS EN  
CEREBROS DE BOVINO MEDIANTE INMUNOENSAYO  
ENZIMATICO

**DANIELLE A. PADILLA DE BEER**

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

PROFESOR GUIA: GUSTAVO FARIAS ROLDAN

FINANCIAMIENTO: CENTRO DE BIOLOGIA Y BIOTECNOLOGIA (CBB) DEL INSTITUTO  
MILENIO DE ESTUDIOS AVANZADOS DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE  
SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG)

**SANTIAGO, CHILE**  
2004

## II. INTRODUCCIÓN.

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas mortales, caracterizadas por un período de incubación muy largo, que afectan a los humanos y a los animales. Las lesiones se restringen al sistema nervioso central (SNC) y consisten principalmente en una vacuolización de la sustancia gris.

El agente causal de estas enfermedades no está completamente identificado, pero la teoría más aceptada en la actualidad es la del “prión”: una forma alterada de una proteína celular funcional (PrPc) que adquiere la capacidad de transformar otras formas proteicas normales en patológicas (PrPsc). Su transmisión puede ser horizontal o vertical y además en algunos casos también existen factores genéticos implicados.

Entre las EET se encuentran la Enfermedad de Creutzfeld Jakob (CJD) y su nueva variante (nv-CJD), en los humanos; el Scrapie en los ovinos y los caprinos y la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) en los bovinos.

En el caso de las EET humanas los síntomas que se destacan son demencia progresiva y ataxia. También se presentan cambios de la personalidad y psicosis. En las EET animales como la BSE y el Scrapie se observan primariamente cambios en el comportamiento y alteraciones en la reacción a estímulos como el tacto y los sonidos.

La BSE ha adquirido gran importancia en el último tiempo debido a su carácter de epidemia en gran escala, principalmente en Europa, con graves consecuencias económicas. Además se ha planteado la posible transmisión al hombre en la nv-CJD, por el consumo de productos cárneos de animales infectados con BSE.

Los métodos clásicos de diagnóstico de la BSE consisten en la observación de signos clínicos y la detección de alteraciones histopatológicas en el SNC. Sin embargo no existen pruebas rutinarias de laboratorio para realizar el diagnóstico en el bovino infectado antes de la presentación de síntomas, por lo cual esta enfermedad representa un gran desafío desde la perspectiva médico veterinaria y científica.

En Chile no se ha detectado ningún caso de BSE, según las evidencias de campo y laboratorio. Sin embargo, a pesar de que nuestro país es considerado por la Unión Europea como de riesgo despreciable de tener un caso, es necesario un estudio más específico mediante métodos de diagnóstico rápidos de la más alta sensibilidad y especificidad disponibles. Es en este sentido que se enmarca el objetivo central de esta memoria: aplicar y evaluar para la detección de proteínas priónicas un inmunoensayo enzimático (ELISA), dentro del plan nacional de vigilancia epidemiológica que mantiene el Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.) en Chile.

### III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas fatales que afectan a humanos y animales. Desde que, hace algunos siglos atrás, se descubrió el Scrapie en ovejas, se han reportado varias Encefalopatías Espongiformes que afectan a los humanos como el Kuru, la Enfermedad de Creutzfeldt Jakob (CJD), el síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker y el Insomnio Familiar Fatal. Dentro de las EET que afectan a los animales se encuentran, además del Scrapie, la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) (o enfermedad de la vaca loca), la Encefalopatía Transmisible del Visón (TME); la Enfermedad del Desgaste Crónico (CWD) en cérvidos y la Encefalopatía Espongiforme Felina (Prusiner, 1995; Hur *et al.*, 2002).

Las EET se caracterizan por tener síntomas neurológicos y características histopatológicas comunes como la degeneración espongiforme del sistema nervioso central (SNC), gliosis y en algunos casos la formación de placas amiloides (Hur *et al.*, 2002). En todas estas enfermedades, el hecho característico es la acumulación en el cerebro de una isoforma infectiva de una proteína de membrana constitutiva (Castilla *et al.*, 2002). Por otra parte, estas patologías tienen períodos de incubación extremadamente largos que van desde meses a varios años (Prusiner, 1995; Hur *et al.*, 2002). En las EET es común la falta de respuesta inflamatoria, así como la ausencia de respuesta inmunológica con anticuerpos específicos (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002).

El estudio de la biología molecular, celular y genética de estas patologías ha permitido establecer una hipótesis que explica su origen y mecanismo de transmisión, llegando a la conclusión de que todas las especies infectadas son susceptibles de transmitir la enfermedad, al menos experimentalmente, de un individuo a otro (Castilla *et al.*, 2002).

Las EET se pueden dividir, de acuerdo a su origen, en tres grupos o formas: esporádicas, genéticas e iatrogénicas (Glatzel y Aguzzi, 2001).

-Las esporádicas son aquellas que aparecen sin causa aparente y para las que no hay explicación en la actualidad.

- Las infecciosas se explican por la interacción de la proteína priónica patológica (PrP<sup>sc</sup>) con la proteína priónica celular (PrP<sup>c</sup>) lo que provoca su transformación a PrP<sup>sc</sup>.
- Las hereditarias corresponden a las provocadas por alteraciones genéticas heredables que facilitan el plegamiento erróneo de la PrP<sup>c</sup> (Torres *et al.*, 2001).

En general, clínicamente, en el desarrollo de las EET se pueden distinguir dos fases:

- La fase psíquica, en que se producen cambios en el comportamiento y el temperamento, y
- La fase orgánica, en que se observan alteraciones motoras graves (Torres *et al.*, 2001).

## **Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en los humanos.**

### **Kuru.**

El Kuru, que en la lengua del grupo tribal Fore de Papua Nueva Guinea significa “temblor”, fue descubierto por Gadjusek en 1957 (Domínguez *et al.*, 1998). La enfermedad se originó en Papua Nueva Guinea y se transmitió a través del canibalismo en fiestas tradicionales o rituales de fertilidad en que los individuos fallecidos eran consumidos por sus familiares y otros de la comunidad. Se piensa que la epidemia se originó a través del consumo de individuos afectados por el CJD esporádico que se sabe que afecta al azar en todas las poblaciones (Weissmann *et al.*, 2002). Durante el período 1957-1970 la tasa de mortalidad anual por Kuru en la mencionada población llegó a ser de 1.250 por 100.000 habitantes (Domínguez *et al.*, 1998). La clasificación del Kuru como una EET se realizó mediante la comparación con Scrapie que mostró similitudes neuropatológicas (Collins *et al.*, 2004).

El reciclaje de priones dentro de esta población aislada, condujo a una epidemia que fue la mayor causa de muerte, principalmente en niños y mujeres adultas (Collinge, 1999). Esto último se explicaría porque las mujeres y los niños consumían las vísceras internas (incluyendo el SNC) y los hombres consumían tejidos de baja infectividad como músculo esquelético por lo que tenían un riesgo más bajo de adquirir la enfermedad (Collins *et al.*, 2004).

Las manifestaciones clínicas más importantes de esta enfermedad son cefalea, artralgias, dificultad en la marcha, ataxia, temblores, mioclonías, disartría, además de disfagia, mutismo y

demencia progresiva. La muerte se producía en los 2 años que seguían a la enfermedad (Domínguez *et al.*, 1998).

A pesar de que la exposición por ingestión oral en el Kuru fue asumida como la principal vía de transmisión, la inoculación con cerebro u otros tejidos mediante cortes o a través de las conjuntivas también son probables. El período de incubación promedio para esta enfermedad se estimó en 12 años (Collinge, 1999). En los casos estudiados no se han descrito mutaciones en el gen codificador de la PrPc aunque sí una mayor frecuencia en sujetos homocigotos para el codón 129 de dicho gen (Domínguez *et al.*, 1998).

### **Síndrome de Gerstmann Straussler Scheinker (GSS)**

Este síndrome se describió por primera vez en 1936 en una familia que presentaba una enfermedad neurodegenerativa con alteraciones cerebelares y demencia (Domínguez *et al.*, 1998). Los signos clínicos típicos son ataxia cerebelar progresiva y empieza alrededor de los 50 a 60 años (Collins *et al.*, 2004).

La mutación específica de esta enfermedad consiste en un cambio de una leucina por una prolina en las posiciones 102 (Prusiner 1995; Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002). También se describe una mutación en el codón 117, con sustitución de valina por alanina. Se menciona que la mutación del codón 102 se relacionaría con las formas en las que predomina la ataxia y la mutación del codón 117 con las formas en que existe mayor demencia (Domínguez *et al.*, 1998).

### **Insomnio Familiar Fatal (IFF)**

Esta enfermedad se describió por primera vez en 1986 en 5 miembros de una familia italiana que presentaban un insomnio intratable. La IFF es causada por una mutación en el codón 178 que causa una sustitución de asparragina por ácido aspártico (Domínguez *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2004). Afecta a individuos en la década de los 50 tiene una duración de 13 a 15 meses. Existen signos inespecíficos como pérdida de peso pronunciada, letargia y cansancio. Como característica fundamental hay una disrupción profunda del ciclo normal del sueño con

insomnio, sobre actividad simpática y anormalidades endocrinas diversas (Collins *et al.*, 2004). Además, existen signos como hiperhidrosis, hipertermia, taquicardia, hipertensión, disritmia respiratoria, ataxia y disartría. En las fases más avanzadas pueden manifestarse alucinaciones (Domínguez *et al.*, 1998).

### **Enfermedad de Creutzfeld Jakob (CJD).**

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1920 por Creutzfeld y un año después Jacob informó de otros 3 casos (Domínguez *et al.*, 1998). Existen diversas variantes clínicas de la CJD. Se puede presentar en la forma esporádica (en el 85% a 90% de los casos), la familiar o heredada (10% a 15% de los casos) o la iatrogénica (<1%) (Lasmézas, 2003).

La CJD esporádica no está asociada a mutación génica conocida y la causa de esta enfermedad se desconoce. Se ha descrito que presenta una incidencia mundial de 1 a 2 casos por millón al año (Glatzel y Aguzzi, 2001; Lasmézas, 2003).

Alrededor del 15% de los casos de CJD son heredados y se han asociado a mutaciones del gen que codifica para la PrPc (PRNP). Se conocen alrededor de 20 tipos de mutaciones de este gen (Collinge, 1999; Collins *et al.*, 2004).

La CJD iatrogénica se diseminó debido a trasplantes de la duramadre, inyecciones con hormona del crecimiento y mediante el uso de instrumentos quirúrgicos contaminados (Domínguez *et al.*, 1998; Lasmézas, 2003). Además se cree que pudo existir transmisión a través del uso de agujas intracerebrales de electroencefalogramas (EEG) contaminadas con priones y se describen unos pocos casos asociados a trasplantes de córnea (Glatzel y Aguzzi, 2001; Weissmann *et al.*, 2002). La contaminación intracerebral directa se asocia con tiempos de incubación de sólo 16 a 28 meses; con trasplantes de duramadre la incubación puede ser de 18 meses a 18 años (con una media de 6 años) y la incubación más larga (de 5 a 30 años) se asocia con inyección subcutánea de hormonas (Collins *et al.*, 2004).

En humanos el gen de la PrPc exhibe un polimorfismo en el codón 129, que puede ser codificado tanto para una valina como para una metionina. La homocigosis en el codón 129 se

ha asociado con susceptibilidad a CJD esporádicas o adquiridas (Collinge, 1999; Dormont, 2002; Collins *et al.*, 2004).

Clínicamente los pacientes que sufren de CJD muestran una amplia gama de síntomas. La forma típica, rápida y progresiva incluye demencia, mioclonos, ataxia cerebelar y disturbios visuales (Glatzel y Aguzzi, 2001). Los pacientes también pueden presentar ansiedad, disturbios del sueño y pérdida de peso (Collins *et al.*, 2004).

Para el diagnóstico se puede utilizar el EEG o la detección del prión en una muestra de líquido céfalo-raquídeo una vez que se han manifestados los síntomas. Sin embargo, para el diagnóstico definitivo es necesario un examen histopatológico del SNC. Las lesiones características son pérdida neuronal, espongirosis y astrogliosis (Glatzel y Aguzzi, 2001). Otro método de diagnóstico posible es la detección en líquido cefalorraquídeo de la denominada “proteína 14-3-3”, la que se utiliza por su alta sensibilidad en el diagnóstico de la CJD clásica sin embargo, no tiene la misma utilidad para la nv-CJD. Esta proteína se encuentra en forma predominante en el SNC y se cree que interviene en la estabilización de otras proteínas neuronales. Su presencia indica procesos agudos o subagudos de degeneración neuronal no específicos de CJD ya que aparece también en otras patologías como infarto cerebral y encefalitis virales severas (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002; Collins *et al.*, 2004).

Se pueden distinguir claramente diferentes tipos de priones con distintas propiedades bioquímicas de PrPsc. Esta diversidad de tipos parece estar determinada por diferencias en la conformación de PrPsc y en los patrones de glicosilación. Un acercamiento a una tipificación ha permitido la identificación de al menos 4 tipos de CJD, determinando que las esporádicas o familiares y las iatrogénicas pertenecen al tipo 1, 2 y 3 y que la variante se ha asociado al tipo 4 (Collinge, 1999).

### **Nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeld Jakob (nv-CJD)**

Esta enfermedad se identificó en 1996 como una variante de la CJD. La descripción original de esta nueva enfermedad producida por priones se basó en una serie de 10 casos (Glatzel y Aguzzi, 2001; Will, 2002). En marzo de 1996 se reconoció la emergencia de la nv-



CJD principalmente como una enfermedad del Reino Unido, alrededor de 10 años después del inicio de la epidemia de la BSE (Almond y Pattison, 1997). Se han detectado 134 casos de nueva variante en el Reino Unido, 6 casos en Francia, 1 en Irlanda, 1 en Italia, 1 en Hong Kong, 1 en Estados Unidos y 1 en Canadá. Es importante mencionar que los individuos afectados de países fuera de Europa habitaron gran parte de su vida en el Reino Unido (Andrews *et al.*, 2003).

La nv-CJD representa una entidad clínico-patológica diferente a la CJD. En comparación con la CJD esporádica la edad de presentación de los pacientes es anormalmente baja. Así la nv-CJD afecta a individuos entre 19-39 años, con un promedio de 29 años, mientras que la CJD esporádica es más frecuente entre 55-70 años. Además en el caso de la nueva variante la duración de la enfermedad es bastante mayor siendo de 7,5-22 meses mientras que en la CJD esporádica la enfermedad dura entre 2,5 y 6,5 meses (Glatzel y Aguzzi, 2001).

En la primera fase de la nv-CJD se destacan los síntomas psiquiátricos y después de alrededor de 6 meses hay signos neurológicos francos, que incluyen ataxia y movimientos mioclónicos involuntarios. Existe un deterioro neurológico progresivo y los pacientes se vuelven mudos, incontinentes y quedan postrados. La muerte sobreviene por infecciones recurrentes (Will, 2002). Una de las características neuropatológicas más importantes de la nv-CJD es la acumulación extensiva de placas esféricas de depósito de proteínas (placas amiloides) en el cerebro de los afectados, principalmente en el cerebelo (Bruce *et al.*, 1997). Aunque una minoría de pacientes con CJD esporádico también presentan estas placas, en el caso de la nv-CJD éstas tienen una disposición característica formando un borde alrededor del tejido microvacuolado. Además hay una invasión generalizada de órganos linfoides como bazo, nódulos linfáticos y amígdalas (Aguzzi *et al.*, 2001; Lasmézas, 2003).

La nv-CJD puede ser claramente diagnosticada, en el apropiado contexto clínico, mediante biopsia de amígdalas (Collinge, 1999). El electroencefalograma no es de gran utilidad en el diagnóstico de la nueva variante a diferencia de la CJD esporádica (Will, 2002). La prueba de detección de la proteína 14-3-3 en este caso no sirve debido a su baja sensibilidad (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002; Will, 2002).

El reconocimiento del fenotipo neuropatológico de la nueva variante con depósito extenso de placas amieloides fue crítico para la identificación de esta enfermedad y la hipótesis de una relación con la BSE (Will, 2002). Los resultados de diversas investigaciones sobre esta enfermedad postulan que la nueva variante tiene su origen en la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE). Esta teoría se basa en tres líneas de argumentos:

- En 1996 se demostró que tanto la distribución de vacuolas neuronales como el patrón de depósito de la PrPsc en placas amieloides son muy similares en ambas enfermedades (Almond y Pattison, 1997). Estas similitudes pueden ser reproducidas cuando homogeneizados de cerebro procedentes de bovinos infectados y de pacientes con nv-CJD son transmitidos a animales experimentales como ratones o primates (Bruce *et al.*, 1997; Will, 2002; Prince *et al.*, 2003).
- Existe una correlación entre los pesos moleculares combinados con el patrón de glicosilación de la PrPsc en ambas enfermedades. Se ha encontrado que al utilizar estos parámetros la PrPsc de la BSE y de la nv-CJD son indistinguibles (Bruce *et al.*, 1997; Glatzel y Aguzzi, 2001; Prince *et al.*, 2003).
- La epidemiología de la BSE y la nv-CJD claramente hablan a favor de una fuerte conexión entre ambas enfermedades. El país europeo con mayor cantidad de casos de nv-CJD es el Reino Unido lo que se correlaciona con la prevalencia de BSE en Europa (Glatzel y Aguzzi, 2001; Prince *et al.*, 2003).

El estudio de la transmisión en ratones transgénicos demostró que las características de transmisión de la nueva variante, incluyendo el período de incubación, son muy similares para la BSE y la nv-CJD (Will, 2002). Uno de los argumentos más poderosos es el estudio de patogénesis en primates. En una investigación en que se inoculó extractos de cerebro de bovinos infectados con BSE en *Cynomolgus mahaques*, después de alrededor de tres años todos los monos (dos adultos y un infante) desarrollaron una encefalopatía espongiforme. La apariencia histopatológica de esta enfermedad era idéntica que la de la nv-CJD (Aguzzi *et al.*, 2001).

Se postula que la exposición por parte de humanos a la BSE se produjo a través del consumo de productos cárnicos infectados, previo a que éstos fueran eliminados de la cadena de consumo mediante la prohibición realizada en 1989 (Almond y Pattison, 1997).

La historia de exposición a BSE en pacientes con nv-CJD sugiere que existen cofactores de susceptibilidad que serían más importantes que el grado de exposición. Algunos cofactores que pueden facilitar la infección vía oral incluye lesiones bucales e infección gastrointestinal o de amígdalas (Collinge, 1999). Los factores de riesgo establecidos para la nv-CJD incluyen la menor edad de presentación, la homocigosis de metionina en el codón 129 del gen de la PrPc y la residencia en el Reino Unido. La razón por la que esta enfermedad afecta a jóvenes no está clara, pero podría relacionarse con un mayor consumo de alimentos específicos o debido a factores biológicos (Will, 2002).

Mediante un estudio que involucró a la Unidad Nacional de CJD del Reino Unido y al Servicio Nacional Sanguíneo de ese país se demostró la posibilidad de que la nv-CJD se pudiera transmitir mediante transfusiones de sangre. Sin embargo, es importante notar que este estudio se basa en un caso particular y que también está la posibilidad de que la infección se haya producido por exposición dietaria al agente de la BSE (Llewelyn *et al.*, 2004).

## **Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en los animales.**

### **Scrapie.**

Esta fue la primera EET reconocida que afecta a las ovejas y a las cabras. La enfermedad se conoce en Gran Bretaña y en otros países de Europa occidental desde hace unos 250 años y posteriormente ha sido descrita prácticamente en todo el mundo (Castilla *et al.*, 2002). El primer reporte de esta enfermedad data de 1732 en Inglaterra y actualmente es una enfermedad endémica en varios países (Glatzel y Aguzzi, 2001). En 1936 esta patología se pudo reproducir experimentalmente en Francia mediante la inyección intraocular, en ovejas sanas, con médula espinal procedente de una oveja enferma (Castilla *et al.*, 2002).

Los síntomas aparecen normalmente entre los 2 y 5 años de edad. Existen varias formas clínicas y diferentes grados de incidencia en rebaños afectados (Lasmézas, 2003). La enfermedad clínica puede durar entre 1 a 6 meses, siendo la muerte inevitable. La sintomatología del Scrapie varía ampliamente en cada animal infectado y tiene un desarrollo muy lento. Los signos clínicos más tempranos incluyen cambios en el comportamiento y el temperamento, seguidos por prurito, ataxia, polidipsia y pérdida de peso. Otros signos

característicos de esta enfermedad son temblores y convulsiones. En muestras de tejido cerebral, microscópicamente se detecta astrogliosis, vacuolización intracelular y pérdida neuronal (Castilla *et al.*, 2002).

El modo exacto de transmisión de esta patología aún no está claro. Además de la vía oral se ha observado la transmisión materna (vertical) a los corderos a través de placentas infectadas (Glatzel y Aguzzi, 2001; Weissmann *et al.*, 2002). El Scrapie es transmisible experimentalmente a otros rumiantes, primates, felinos y a una variedad de ratones (Lasmézas, 2003).

Ciertas variaciones genéticas entre los individuos pueden determinar la susceptibilidad a la enfermedad y los tiempos de incubación (Castilla *et al.*, 2002). Variaciones aminoacídicas en posición 136 (valina V y alanina A), 154 (arginina R e histidina H) y 171 (glutamina Q y arginina R e histidina H) de la proteína priónica del ovino influyen la susceptibilidad a infecciones naturales y experimentales con Scrapie. En general los alelos PrP ovinos VRQ y ARQ se relacionan con una susceptibilidad alta mientras que los alelos ARR y AHQ coinciden con una susceptibilidad baja a la infección con Scrapie (Buschmann *et al.*, 2004). Aún no se han establecido riesgos ocupacionales ni dietarios de la exposición de los humanos a productos ovinos, lo que sugiere que los agentes del Scrapie no son un peligro para la salud humana bajo condiciones de exposición natural (O.I.E., 2000).

### **Encefalopatía Transmisible del Visón (TME).**

Esta fue la primera EET identificada en animales no domésticos. Afecta a los visones (*Mustela vison*), es de rara presentación y se asocia con la exposición a través de alimento contaminado con un agente de EET. La enfermedad se detectó inicialmente en los Estados Unidos en 1965 y desde entonces se han descrito casos en Canadá, Finlandia, Alemania y Rusia (Williams y Miller, 2003). No hay ninguna evidencia de que la infección del agente se produzca por contacto entre especies de visones o por la alimentación de la madre a las crías (Castilla *et al.*, 2002).

El período de incubación promedio de la TME es de 7 meses. La enfermedad clínica tiene una duración de entre 3 días y 6 semanas, produciéndose finalmente la muerte. Los signos clínicos de esta enfermedad son descoordinación, dificultad al caminar, espasmos de miembros posteriores, automutilación de la cola y masticación compulsiva. Cerca de la muerte los visones afectados se encuentran adormecidos y no responden a estímulos externos (Torres *et al.*, 2001). Al examen microscópico de cortes de tejido cerebral se evidencia microvacuolización de la materia gris. Resultados de diversos estudios indican que existe poca o nula barrera interespecífica entre el ganado vacuno y el visón (Castilla *et al.*, 2002). Estudios de inoculación intracerebral de TME en bovinos muestran algunas similitudes con la BSE como períodos de incubación, signos clínicos y lesiones neuropatológicas. Sin embargo, la distribución de lesiones es diferente. Los visones fueron incluidos en la prohibición alimentaria de 1996, por lo que el riesgo de transmisión a bovinos u otros rumiantes es nulo (Williams y Miller, 2003). La TME se ha transmitido experimentalmente además a ovejas, cabras y hámster, pero no se ha podido transmitir a ratones (Lasmézas, 2003).

### **Enfermedad del Desgaste Crónico (CWD).**

Esta fue la segunda EET descrita en animales no domésticos y afecta a ciervos y alces. El primer caso se describió en 1967 y se presentó en un ciervo mula de cautiverio. Prácticamente todos los casos aparecidos han sido en Norteamérica (Castilla *et al.*, 2002). Sin poder descartar un origen genético de la enfermedad en la población de cérvidos es probable que el origen del Scrapie tenga un nexo en común con el de los cérvidos, aunque por el momento no está claro que el CWD sea el paso de Scrapie a cérvidos o bien se trate de una enfermedad natural diferente (Castilla *et al.*, 2002). La transmisión entre los propios animales mantiene la CWD en la ausencia de la contaminación por alimentos, tanto en animales libres como capturados (Williams y Miller, 2003).

La enfermedad se presenta en animales de ambos sexos enteros o castrados, con edades comprendidas entre 2,5 y 7 años. Dentro de los signos clínicos destaca una pérdida de peso crónica que lleva a la muerte. La muerte normalmente no es directamente debida a CWD sino a infecciones secundarias que el animal no puede superar (Torres *et al.*, 2001).

Los signos clínicos más consistentes son: pérdida de peso progresiva, apatía, depresión, ataxia, emaciación severa, deshidratación, caída de cabeza y orejas, inexpresividad facial, salivación excesiva, rechinar de dientes, polidipsia y poliuria. El comportamiento del animal se altera perdiendo el miedo a los humanos y disminuyendo la interacción con otros individuos del grupo. Normalmente el animal muere a los 6 meses de aparecer los síntomas (Castilla *et al.*, 2002). Microscópicamente se observan lesiones en el cerebro y en la médula espinal con microcavitaciones de la sustancia gris. La degeneración y pérdida neuronal se presenta en ausencia de respuesta inflamatoria. También aparecen importantes lesiones en el bulbo olfatorio, corteza, hipotálamo y núcleos vagales parasimpáticos (Torres *et al.*, 2001). Los bovinos, ovinos y caprinos son susceptibles a CWD por rutas artificiales de inoculación intracerebral (Williams y Miller, 2003).

### **Encefalopatía Espongiforme Felina (FSE).**

Esta enfermedad afecta a los felinos. Se diagnosticó por primera vez en 1990 en un gato doméstico y probablemente se originó a partir de la contaminación de alimento con tejido bovino (Ryder *et al.*, 2001; Castilla *et al.*, 2002). Al mismo tiempo que aparecía la BSE en el Reino Unido fueron apareciendo casos en felinos salvajes de distintos zoológicos del país. Tales fueron los casos de un guepardo, un ocelote, un tigre y un puma. En estos casos los felinos fueron alimentados con carcasas y vísceras que contenían el sistema nervioso central (médula espinal) de bovinos (Castilla *et al.*, 2002). En la transmisión a ratones, las propiedades biológicas del agente infeccioso de la FSE han demostrado ser idénticas a las del agente de la BSE. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la FSE está relacionada con la BSE y que resulta del consumo de alimentos contaminados (Ryder *et al.*, 2001). No existen datos que hagan presumir la presencia de un riesgo sanitario para el humano por contacto o la eventual convivencia con un felino afectado (Castilla *et al.*, 2002).

La mayor parte de los casos diagnosticados han aparecido en individuos con una edad comprendida entre los 4 y 9 años (Castilla *et al.*, 2002). La FSE se caracteriza por sus signos neurológicos progresivos, que incluyen ataxia, hiperreactividad y cambios de comportamiento (Ryder *et al.*, 2001). Además se observa temblor muscular generalizado y dilatación pupilar (Castilla *et al.*, 2002). En el examen post mortem, los cambios histopatológicos están limitados

al SNC y consisten en vacuolización de materia gris del cerebro y la médula espinal (Ryder *et al.*, 2001).

Hasta el 2001 se habían reportado 87 casos de FSE en gatos domésticos del Reino Unido y unos pocos casos en Noruega e Irlanda del Norte (Ryder *et al.*, 2001).

## **Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE).**

### **Epidemiología.**

Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en 1986 en el Reino Unido por Wells y Wilesmith (Prusiner, 1995). En 1985 se observó en el sur de Inglaterra, una vaca adulta con un síndrome neurológico que fue descrito como “hipersensibilidad crónica con síndrome de descoordinación”. Siete meses después y hasta 1986, en el mismo rebaño, se dieron nueve casos más con los mismos síntomas clínicos. En ese mismo año el análisis histopatológico del cerebro de estos animales mostró una gran similitud con los cerebros de animales infectados por Scrapie (Castilla *et al.*, 2002). A partir de esto, se postuló que la enfermedad tuvo su origen en el consumo, por parte de los bovinos, de suplementos proteicos como harinas de carne y hueso contaminados con Scrapie. Desde que se pensó que el origen de la BSE estaba en el Scrapie, surgieron varias teorías. Dentro de estas se destacan las siguientes:

- La BSE fue causada por un agente de Scrapie que permaneció inalterable en su expresión fenotípica en los bovinos.
- La BSE fue causada por un agente de Scrapie que cambió en los bovinos durante su reciclaje.
- La BSE fue causada por una mutación genética espontánea del gen de la PrPc del bovino.
- La BSE se originó a partir de otra especie mamífera afectada con una EET, posiblemente un ungulado africano o un félido, cuya carcasa se incorporó en la alimentación de bovinos (Prince *et al.*, 2003).

La teoría más aceptada hasta hoy, es que el origen de la BSE está en las harinas de carne y hueso contaminadas con el agente del Scrapie. Esto se debería a un cambio en su

procesamiento debido principalmente a una disminución de la temperatura y de los solventes utilizados en la extracción, con lo cual el prión mantuvo su infectividad y produjo la enfermedad en los bovinos. Por esto, internacionalmente se prohibió en la alimentación de los rumiantes el uso de proteínas derivadas de mamíferos (S.A.G., 2003). La epidemia de la BSE se expandió mediante la inclusión de carcasas bovinas infectadas en la alimentación de otros bovinos. En 1996 se habían diagnosticado aproximadamente 170.000 bovinos con BSE en el Reino Unido (Momcilovic y Rasooly, 2000).

La enfermedad se ha diseminado a muchos otros países europeos involucrando tanto bovinos importados como nativos. El origen de los casos nativos parece ser resultado directo o indirecto de la exportación de bovinos o de harinas de carne y hueso infectadas desde países con BSE, principalmente el Reino Unido. Casos de bovinos nativos afectados se han detectado además en Bélgica, Dinamarca, Irlanda, Francia, Luxemburgo, Holanda, Portugal y Suiza, entre otros (O.I.E., 2000).

La importancia de la BSE, además de las consecuencias económicas para la industria derivada de la explotación de ganado vacuno, aumentó al considerarse el riesgo potencial para el hombre al aparecer una nueva variante de la CJD (nvCJD) cuyo agente parecía ser indistinguible del de la BSE. Se postula que esta nueva variante tuvo su origen en el consumo de productos cárneos de bovinos infectados con BSE (Castilla *et al.*, 2002). Se estima que alrededor de 50.000 bovinos infectados entraron a la cadena alimenticia humana antes del reconocimiento del primer caso de BSE y que la exposición mayor de la población del Reino Unido fue alrededor de 1989, momento en que se introdujo la prohibición del uso de harinas de carne y hueso en la alimentación bovina con lo que la incidencia de BSE declinó (Collinge, 1999). En 1994 esta prohibición se extendió a toda la Unión Europea (Glatzel y Aguzzi, 2001). En 1996 se amplió a todos los animales de granja del Reino Unido incluyendo a los equinos y peces (O.I.E., 2000). En este mismo año la Comisión Europea introdujo la prohibición de exportación de carne bovina desde el Reino Unido. Para solucionar el problema de la BSE, el Reino Unido sacrificó todos los bovinos mayores de 30 meses. En el 2000 más de 3.841.000 bovinos habían sido sacrificados, con consecuencia económicas muy nefastas (Momcilovic y Rasooly, 2000).



En la tabla N° 1 se presentan los casos de BSE importados y nativos que se han presentado desde el año 1989 hasta Enero del 2004 (O.I.E., 2004).

**Tabla N° 1. Presentación de casos BSE desde 1989 hasta Enero del 2004 (O.I.E., 2004).**

| PAÍS           | CASOS   | PAÍS            | CASOS |
|----------------|---------|-----------------|-------|
| Reino Unido    | 183.616 | Irlanda         | 1353  |
| Francia        | 891     | Portugal        | 858   |
| Suiza          | 453     | España          | 395   |
| Alemania       | 301     | Bélgica         | 120   |
| Italia         | 117     | Holanda         | 71    |
| Eslovaquia     | 14      | Dinamarca       | 13    |
| Polonia        | 11      | República Checa | 9     |
| Japón          | 9       | Eslovenia       | 3     |
| Luxemburgo     | 2       | Finlandia       | 1     |
| Canadá         | 2       | Israel          | 1     |
| Grecia         | 1       | Austria         | 1     |
| Liechtenstein  | 2       | Omán            | 2     |
| Islas Malvinas | 1       | Estados Unidos  | 1     |

Los casos de Omán, Islas Malvinas y Estados Unidos sólo incluyen animales importados. El caso de Estados Unidos se confirmó en Enero del 2004 y consistió en un animal importado desde Canadá (O.I.E., 2004).

### **Etiología.**

Existen tres hipótesis más importantes sobre el agente causal de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles: el virus, el virino y el prión. Hoy en día hay grandes evidencias a favor de la hipótesis del prión, por lo cual ésta es la más aceptada (Hur *et al.*, 2002). Según esta hipótesis el agente causal denominado prión (partícula infecciosa de naturaleza proteica) corresponde a la forma alterada de una proteína celular funcional (PrPc) de los mamíferos que pierde su función normal pero adquiere la capacidad de transformar la forma normal en patológica (PrPsc) (Prusiner, 1995).

La proteína celular funcional (PrPc) de la cual se origina el prión es una glicoproteína que incluye dos sitios de unión para moléculas de azúcar (en posiciones 180 y 196) (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002). La PrPc se encuentra predominantemente en el SNC (Hur *et al.*, 2002), anclada a la membrana celular de las neuronas a través de un glicano-fosfatidil-inositol (GPI) (Weissmann *et al.*, 2002). Además se encuentra, en menor cantidad, en otros tejidos del organismo de los mamíferos (Hur *et al.*, 2002). La vida media de la PrPc en la superficie celular es de 5 horas, después de la cual la proteína es interiorizada y degradada en el compartimiento endolisosomal (Dormont, 2002).

La función de la PrPc aún constituye un tema controvertido. El estudio en ratones transgénicos, en los que se ha suprimido el gen que la codifica, no ha mostrado graves alteraciones en su comportamiento. Hoy en día las investigaciones se centran en una serie de aminoácidos repetitivos (de 8 unidades) en la estructura primaria de la proteína que presentan una afinidad específica por los iones de cobre. Se postula así que desempeña una importante función en el metabolismo del cobre y en posibles mecanismos de protección de las uniones sinápticas frente a los procesos oxidativos (Brown *et al.*, 1997; Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002). Es el amino-terminal el que contiene este octapéptido repetitivo, PHGGGWGQ, el cual se repite 4 veces y es una de las regiones más preservadas de la PrPc de mamíferos (Brown *et al.*, 1997). Además se ha mencionado que la PrPc puede tener un rol en la fisiología del sueño, en interacciones con la matriz extracelular, en apoptosis y en traducción de señales (Dormont, 2002).

La proteína PrPc está codificada por un gen cromosómico que es muy similar en las distintas especies de mamíferos. El gen de la PrPc existe en una única copia y está localizado en el brazo corto del cromosoma 20 en el hombre y en una región equivalente del cromosoma 2 en ratones (Torres *et al.*, 2001). Consta de unos 750 nucleótidos y codifica una proteína de unos 250 aminoácidos (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002).

En animales transgénicos, que expresan grandes números de copias del gen de la PrPc, el tiempo de incubación es inversamente proporcional con la expresión de PrPc, por lo tanto la susceptibilidad a la infección y propagación de los priones dependería de la cantidad de PrPc disponible en el huésped (Dormont, 2002).

La PrPc tiene 2 posibles sitios de glicosilación, por lo tanto, se pueden describir 3 glicofomas de ella (Dormont, 2002). El análisis por resonancia magnética nuclear de una PrP recombinante sugiere que consiste de tres regiones  $\alpha$ -helicoidales (dos unidas por un puente disulfuro), dos segmentos cortos  $\beta$  plegados antiparalelos y un desordenado y flexible N-terminal. El resto de la estructura es el de una pequeña proteína globular (Dormont, 2002; Collins *et al.*, 2004).

La PrPc se ha encontrado en todas las especies de mamíferos en las que se ha buscado, así como también en algunas aves y reptiles. Las diferencias en la secuencia de la proteína entre las distintas especies son pequeñas, con más del 85% de homología entre los diferentes mamíferos (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002).

Diferentes terminologías son utilizadas en la literatura científica para diferenciar las formas normales y las anormales de PrP. La PrP normal, llamada PrPc (isoforma celular de la proteína del prión), tiene un peso molecular de 33-35 kDa, es soluble, sensible a compuestos químicos diversos y susceptible a la digestión con proteinasa K, en cambio la PrP anormal llamada PrPsc (isoforma Scrapie de la proteína del prión), que también pesa 33-35 kDa, es insoluble, muy resistente a la proteinasa K, al calor y a muchos compuestos químicos, lo cual se debe a su estructura. Al contactarse con la proteinasa K, la PrPc se destruye completamente, mientras que la PrPsc solo sufre una digestión parcial, manteniéndose resistente e infectiva una fracción de 27-30 kDa (Prusiner, 1991).

A través de diversos hallazgos, se descubrió que el prión es resistente a la inactivación con radiaciones ultravioleta y también a la ionizante, entre otras, por lo que se especuló que no contenía ácido nucleico (Prusiner 1998; Dormont, 2002). Luego se llegó a la conclusión de que la PrPc es codificada por un gen cromosomal y no mediante ácido nucleico (Prusiner, 1998). Además la PrPsc resiste la inactivación con nucleasa, radiación UV a 254 nm, tratamiento con cationes divalentes, iones metálicos quelantes, ácido (entre pH 3 y 7), hidroxilamina, formalina, ebullición y proteasas. La infectividad de la PrPsc disminuye mediante tratamientos con urea, ebullición en SDS, álcali (pH>10), autoclave a 132°C durante más de 2 horas, solventes orgánicos desnaturalizantes (fenol) o agentes caotrópicos como el isocianato de guanidina (Torres *et al.*, 2001). Para la desinfección física de PrPsc se recomienda el autoclavado a 134 -

138°C por mínimo 18 minutos a 3 bar. También se recomienda el hipoclorito de sodio con un 2% de cloro o hidróxido de sodio 2 N, aplicados por más de una hora a 20°C para superficies y toda la noche para equipos (O.I.E., 2000).

Otro modelo propuesto consiste en que el agente de las EET es un tipo de virus y que contiene ácido nucleico. El fundamento principal de esta hipótesis es la identificación de múltiples linajes de agentes del Scrapie, con características diferentes de períodos de incubación y distintos patrones neuropatológicos cuando se transmiten a ratones. Sin embargo, es difícil aceptar esta teoría debido a la resistencia extrema de este agente no convencional a los procedimientos de inactivación microbiana (O.I.E., 2000). Las características que diferencian a los priones de los virus se resumen en la Tabla N° 2 según Torres *et al.*, (2001).

**Tabla N° 2. Diferencias entre priones y virus. (Torres *et al.*, 2001)**

| <b>PRIONES</b>   | <b>VIRUS</b>   |
|--|--|
| Formas moleculares múltiples (isoformas)                               | Formas únicas con diferentes morfologías estructurales                             |
| No presentan ácido nucleico esencial dentro de la partícula infecciosa | Poseen un genoma formado por ácido nucleico que sirve de molde para la replicación |
| No inducen respuesta inmune  | Inducen respuesta inmune más o menos intensa según el tipo                         |
| Un dímero de PrP mide entre 0,5 a 1 nm.                                | Miden entre 20 a 200 nm.   |
| El único componente conocido es la proteína PrP <sup>sc</sup>          | Están compuestos por ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes               |

La principal diferencia entre PrP<sup>c</sup> y PrP<sup>sc</sup> se basa en su estructura secundaria ya que ambas formas proteicas poseen idéntica secuencia aminoacídica. En el caso de la PrP<sup>c</sup> la estructura secundaria está compuesta por un 42% de  $\alpha$ -hélice y un 3% de lámina  $\beta$ , en cambio la PrP<sup>sc</sup> contiene un 43% de lámina  $\beta$  en desmedro de la  $\alpha$ -hélice (Torres *et al.*, 2001). La alta proporción de lámina  $\beta$ , le confiere la capacidad a la PrP<sup>sc</sup> de formar complejos supramoleculares denominados amieloides que se producen cuando se acumulan en forma de

placas, las cuales se pueden observar en diversas EET (Weissmann *et al.*, 2002; Collins *et al.*, 2004).

A partir de tejido cerebral infectado se pueden extraer vesículas membranosas ricas en PrPsc. La proteólisis parcial de estas vesículas dan lugar a partículas con forma de fibras que se pueden visualizar al microscopio electrónico. La mayoría de estas partículas tienen un diámetro uniforme de 11 nm con una longitud media de 165 nm. Estas fibras son lisas, parecidas a listones y raramente aparecen retorcidas. Las fibras están formadas por polímeros de PrPsc 27-30 que corresponde a la fracción resistente a proteinasa K (Torres *et al.*, 2001; Lasmézas, 2003).

La PrP 27-30 presenta el 21% de estructura  $\alpha$  y hasta el 54% de estructura  $\beta$ . El alto contenido en estructura  $\beta$  es compatible con la información disponible para otras proteínas responsables de enfermedades en que aparecen depósitos de placas amiloides como la enfermedad de Alzheimer (Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002). La multiplicación de la infectividad de los priones es un proceso exponencial que implica obligatoriamente la conversión post-traducciona l de PrPc en PrPsc (Prusiner, 1995; Gasset y Westaway, 2000). La PrPsc se produce por un plegamiento erróneo de la PrPc, lo que le confiere las propiedades que permiten diferenciarlas como son la solubilidad y la resistencia a proteasas. Se ha propuesto que este plegamiento consiste en una transición de las  $\alpha$ -hélices a láminas  $\beta$ . Las causas que provocan este plegamiento definen las formas descritas de las EET: esporádicas, infecciosas o hereditarias (Torres *et al.*, 2001).

De esta forma, la PrPsc se autopropaga al contactarse con una PrPc en la cual produce un cambio conformacional que inicia la cascada en que las nuevas moléculas convertidas cambian la conformación de otras PrPc y así sucesivamente, hasta que la proteína patológica acumulada (PrPsc) alcanza niveles peligrosos (Weissmann *et al.*, 2002).

Para explicar el mecanismo de propagación de los priones se han propuesto varios modelos. En el modelo de desnaturalización-renaturalización la cinética de la reacción está controlada por el cambio conformacional siendo éste una etapa limitante ya que implica la desnaturalización de la PrPc y su posterior renaturalización en PrPsc. Para este modelo:

- 1) PrPc es el sustrato y PrPsc el producto de reacción.

- 2) La velocidad de reacción depende de la concentración del sustrato
- 3) PrPsc regula la conversión de PrPc en PrPsc.
- 4) Un análogo de sustrato, una PrPc de otra especie, retrasa la conversión actuando como inhibidor competitivo (Torres *et al.*, 2001)

El modelo de polimerización nucleada por condensación no covalente supone que las dos conformaciones se encuentran en equilibrio, pero la estabilización de la forma patológica ocurre a través de la formación de un núcleo, siendo éste un proceso muy lento. Una vez formado el núcleo inicial las adiciones de nuevas moléculas consiguen acelerar el proceso, desplazando el equilibrio hacia la forma patológica de la PrP (Torres *et al.*, 2001).

En el cambio conformacional no se descarta la presencia de alguna proteína adicional (proteína X) que pudiera colaborar en el proceso. Incluso es posible que la propia presencia de cationes metálicos como el Cu<sup>2+</sup>, pudiera participar en éste (Prusiner 1998; Rey-Gayo y Calbo-Torrecilla, 2002). También se ha mencionado la posible participación de glicoaminoglicanos sulfatados y otros polianiones (Caughey y Kocisko, 2003). Se ha descrito un plasminógeno implicado en la neurotoxicidad como una proteína de unión de la PrPsc (Fischer *et al.*, 2000).

Se han encontrado alrededor de 20 mutaciones que, por si solas o en combinación, parecen aumentar la susceptibilidad de la PrPc para sufrir el cambio hacia la forma patógena (Prusiner, 1998; Rey-Galo y Calbo, 2002).

Existen evidencias de que ácidos nucleicos pueden estar involucrados en la propagación de la infección de las EET. Se describe que se requiere RNA simple de vertebrados para la amplificación *in vitro* de PrPsc aunque la identidad de este RNA no está completamente identificada. Esta teoría surge a partir de limitaciones en los modelos de conversión *in vitro* libre de células, en que la PrPsc formada en estos modelos nunca ha demostrado constituir nueva infección. Diversos otros estudios apoyan esta hipótesis y se describe que el RNA en este caso sería un cofactor presente en las células del hospedero, requerido para la conversión de PrPc, más que un componente obligatorio del prion transmisible (Caughey y Kocisko, 2003).

## **Tipos o linajes de priones.**

Se han descrito diferentes tipos de priones. Estos difieren en sus tiempo de incubación, en sus patrones de lesiones en los cerebros afectados y en las características físico-químicas de la PrPsc producida. Existe la hipótesis de que la especificidad de los tipos se asocia con el patrón de glicosilación de la PrPsc (Weissmann *et al.*, 2002) y por lo tanto, los diferentes tipos pueden ser caracterizados biológica y bioquímicamente. Para la tipificación también se utiliza la identificación biológica que comprende la inoculación en ratones y mediante ella se identifica el período de incubación y la distribución de vacuolización (Lasmézas, 2003).

Además, la hipótesis conformacional propone que cada tipo se asocia con diferentes conformaciones de PrPsc y que cada uno de éstos puede convertir la PrPc de su hospedero en un prión idéntico a si mismo. Se menciona que los diversos tipos de priones tienen diferente susceptibilidad a la proteinasa K, lo que se atribuye a las distintas conformaciones de la PrPsc (Weissmann *et al.*, 2002). Las variaciones de las estructuras terciarias de PrPsc probablemente se correlacionan con diferencias en la exposición superficial y explica las diferencias de sitios de acción de la proteinasa (Collins *et al.*, 2004). Por otra parte, los distintos tipos de priones se diferencian en su resistencia a la inactivación química o al calor, además de diferir en su patogenicidad y distribución en el organismo afectado (Lasmézas, 2003). Se ha descrito que moléculas de PrPsc de hasta ocho diferentes tipos de priones pueden ser diferenciadas en relación con su afinidad relativa por un anticuerpo monoclonal dirigido contra un epítipo que está completamente expuesto en la PrPc, pero sólo parcialmente en la PrPsc (Weissmann *et al.*, 2002).

Por otra parte, moléculas de PrPsc derivadas de animales afectados por diferentes tipos de priones, exhiben diferentes pesos moleculares cuando se les analiza por “inmunoblot”. Esto se debería a las variaciones en el sitio de acción de digestión por la proteinasa K. Por ejemplo, la PrPsc derivada de ovinos afectados con BSE es digerida en un sitio diferente por la proteinasa K que la PrPsc derivada de ovinos afectados por Scrapie y resulta en un prión de un menor peso molecular. Este efecto ha sido propuesto como un posible marcador diagnóstico para diferenciar entre BSE y Scrapie en ovinos. Estas variaciones no afectan el

desarrollo de las denominadas “pruebas rápidas”, detectando éstas la BSE en ovinos. (Buschmann *et al.*, 2004).

En el 2003 el Instituto Nacional de Salud Animal en Japón reportó que un novillo nativo resultó positivo para BSE y que las características de este prión eran diferentes de los de la BSE clásica. Dos días más tarde en Italia, el Centro de Referencia Nacional para encefalopatías animales, reportó que 2 de 110 vacas que resultaron positivas a BSE, presentaban priones diferentes a los clásicos. Los nuevos tipos de priones fueron detectados por las pruebas existentes, y se identificaron mediante Western Blot. En ambos casos, los priones fueron encontrados durante un muestreo de rutina en matadero de animales libres de signos clínicos (Willeroider, 2003). En enero del 2004, en programas de vigilancia de rutina, se detectaron 6 casos atípicos de BSE en Francia (O.I.E., 2004).

### **Transmisión.**

No hay evidencia de transmisión horizontal ni maternal de la BSE. Tampoco se ha evidenciado riesgo para el semen, la leche y los embriones. Experimentalmente se ha demostrado que la BSE se puede transmitir entre bovinos mediante exposición oral y parenteral con tejido cerebral infectado (O.I.E., 2000; Weissmann *et al.*, 2002).

La ruta intracerebral es la más infectiva para la contaminación de priones y la oral la menos efectiva. Se describe que 1 unidad infecciosa por vía intracerebral es igual a 125.000 unidades infecciosas por ruta oral (Dormont, 2002). Otros autores mencionan que esta proporción es de 1 a 60.000 (Prince *et al.*, 2003). En estudios de laboratorio se ha observado que con la exposición oral de 10 g de cerebro de bovinos afectados de BSE se mueren la mayoría de las ratas expuestas (Collinge, 1999). La exposición oral experimental en bovinos a un pool de SNC infectado con BSE ha demostrado que bovinos pueden infectarse con 1 g de material infectado, aunque recientemente se ha reportado infección con 0,1 g (Prince *et al.*, 2003).

La transmisión entre distintas especies es un proceso estocástico. En el caso de ocurrir, este proceso es muy poco eficaz y presenta un prolongado tiempo de incubación (Torres *et al.*,



2001). Las EET, independiente de la especie animal afectada, pueden tener capacidad de transmisión al menos experimentalmente de un individuo a otro. Sin embargo, debido a la existencia de la barrera entre especies, que se establece como consecuencia de que la PrPc de una especie no es completamente idéntica a la PrPc de otra, hace que el príon no tenga la misma capacidad de infección entre individuos de distinta especie que entre individuos de la misma especie. Por la misma razón la capacidad de infección de los priones es muy diferente dependiendo de la especie de que se trate. Mientras que la infección por priones de BSE en el hombre es un hecho documentado, la infección en el hombre por priones ovinos de Scrapie, capaces de infectar a la especie bovina, no ha podido ser demostrada (Castilla *et al.*, 2002).

Una vez que el príon atraviesa la barrera de especie y por lo tanto adquiere la secuencia proteica determinada por el gen del hospedero, en infecciones sucesivas los tiempos de incubación en la nueva especie se acortan sensiblemente (Torres *et al.*, 2001).

Para propósitos experimentales y bioensayos es posible producir ratones con genes PrP modificados. Estos ratones pueden tener secuencias genéticas de humano, bovino u ovino insertos en su genoma. Esto puede proveer una opinión sobre las barreras interespecies y es una forma más rápida de medir la infectividad. Estos ratones son aproximadamente 10 veces más sensibles a la infección con BSE que bovinos y 10.000 veces más sensible que ratones no modificados (Prince *et al.*, 2003). La demostración indiscutible que para la producción de PrPsc es necesaria la PrPc es la resistencia de los ratones *knock out* (ratones que no expresan la PrPc al tener inactivado su gen) tras la inoculación intracerebral de priones (Castilla *et al.*, 2002).

Bajo condiciones experimentales los ovinos son fácilmente infectados oralmente con el agente de la BSE y presentan signos clínicos indistinguibles del Scrapie. La tipificación de priones en ratones es utilizado para diferenciar infección con BSE y Scrapie en los ovinos, comparando tiempos de incubación y patrones patológicos. Recientemente se han desarrollado métodos para esta diferenciación que se basan en describir el peso molecular y los patrones de glicosilación de la PrPsc acumulada en el cerebro de los animales infectados (Buschmann *et al.*, 2004). También es posible transmitir la BSE experimentalmente a especies como ratones, cerdos, visones, ovejas y primates (Prince *et al.*, 2003).

## **Patogénesis.**

El tiempo de los eventos en la patogénesis de las EET está determinado por la trayectoria de la acumulación de PrPsc que depende del linaje del agente, del genotipo del hospedero y de la vía de infección. Ésta y la acumulación de PrPsc ocurre primero en las placas de Peyer, tejido linfoide asociado a intestino y ganglios del sistema nervioso entérico. Esto sucede mucho antes de la detección de PrPsc en el SNC (Brun *et al.*, 2003; Huang y MacPherson, 2004).

En las ovejas infectadas con Scrapie se encuentran acúmulos de PrPsc asociada al tejido linfoide intestinal en las placas de Peyer y en ciervos inoculados oralmente, la isoforma patógena de la proteína aparece en aquellos tejidos linfoides que drenan hacia los tractos intestinales inferiores. Hasta la fecha, no se ha podido demostrar la implicación de los tejidos linfoides en la patogénesis de la BSE (Brun *et al.*, 2003), a excepción del tejido linfoide asociado a intestino después de un tiempo determinado (Aguzzi *et al.*, 2001), específicamente el ileo distal (Ryder *et al.*, 2001).

En la BSE el agente ingresa por vía oral y debido a su alta resistencia sobrevive en el tracto digestivo, para luego infectar el SNC (Aguzzi *et al.*, 2001). La neuroinvasión ocurre alrededor de la mitad del tiempo de incubación (Weissmann *et al.*, 2002). El grado de dispersión en el sistema nervioso periférico se calcula en alrededor de 1 a 2 mm por día (Glatzel y Aguzzi, 2000). Por medio de trabajos experimentales, administrando por vía periférica priones en ratones, se ha demostrado que existen 2 vías de neuroinvasión por parte del PrPsc, que entre otras cosas dependen de la cantidad de unidades infecciosas administrados y el sitio de inyección. Una de ellas corresponde directamente a los nervios periféricos y la otra primero pasa por el sistema linforeticular y luego a través de los nervios periféricos. En este último caso sería necesario la replicación en tejidos linforeticulares para un eficiente transporte al SNC (Aguzzi *et al.*, 2001).

Dependiendo del hospedero los tejidos linforeticulares, particularmente el bazo, pero también nódulos linfáticos, son sitios en que los priones replican y se acumulan. Este es el caso del Scrapie en ovejas, la BSE experimental en ovejas, la nv-CJD en humanos y el Scrapie

experimental en ratones (Weissmann *et al.*, 2002). Se postula que células mieloides dendríticas median el transporte dentro del sistema linforeticular. Se requieren células B maduras para la amplificación de priones en el bazo, sin embargo, no por ser ellas mismas reservorios de priones, sino por que son necesarias para la maduración de las células dendríticas foliculares (Weissmann *et al.*, 2002). Se cree que estas células dendríticas pueden constituir un puente entre el lumen del intestino y los tejidos linfáticos secundarios en los que el agente replica (Huang y MacPherson, 2004). En el caso de la BSE el sistema linforeticular (SLR) aparentemente tiene una muy baja participación en comparación con otras EET. Un reciente estudio sugiere que la poca participación del SLR puede ser el resultado de la forma en que la PrP<sup>c</sup> se expresa en las células dendríticas foliculares en el sistema inmune del bovino. Esta forma puede impedir la replicación de la PrP<sup>sc</sup> en este sistema (Prince *et al.*, 2003).

Una de las funciones de los macrófagos dentro de los centros germinales es endocitar los inmunocomplejos atrapados en la superficie de las células dendríticas foliculares. Se pudo comprobar que la disminución experimental de la población de macrófagos incrementaba la acumulación de PrP<sup>sc</sup> y de la infectividad en el bazo y reducía significativamente los tiempos de incubación en bioensayos de ratón. Esto sugiere, por un lado, que el papel de estas células consistiría en la eliminación de los agregados de PrP<sup>sc</sup> y por otro, que la degradación lisosómica de la PrP<sup>sc</sup> en los macrófagos debe ser un fenómeno menos eficiente que la transformación de PrP<sup>c</sup> a PrP<sup>sc</sup> (Brun *et al.*, 2003).

Desde el sistema linforeticular, así como desde otros sitios, los priones viajan hacia el SNC a lo largo del sistema nervioso periférico directamente a través del nervio vago o a través de la médula espinal (Weissmann *et al.*, 2002). Una vez que llega al SNC la PrP<sup>sc</sup> se acumula en los lisosomas, los cuales una vez repletos podrían estallar y lesionar a las células vecinas (Aguzzi *et al.*, 2001).

A medida que las neuronas se vuelven afuncionales, morfológicamente se observan como vacuolas u orificios en el tejido cerebral, mientras que los priones que ocasionan esta alteración quedan libres para atacar a otras neuronas o bien, se acumulan formando fibrillas en el tejido extracelular que se denominan SAF (fibrillas asociadas a Scrapie) (Prusiner, 1995).

Además de estas alteraciones hay activación de células de la microglía y estimulación de la producción de filamentos intermedios por parte de los astrocitos (Aguzzi *et al.*, 2001).

Los resultados de diversos experimentos indican que la muerte neuronal puede ocurrir por 2 vías: por acumulación de PrP<sup>sc</sup> en el citoplasma a través de un mecanismo tóxico; y por apoptosis de neuronas no infectadas inducida por PrP<sup>sc</sup> (Dormont, 2002). Cada vez hay más evidencias de que la PrP<sup>sc</sup> no es neurotóxica por sí sola. Ratones *knock out* (sin expresión de PrP) son inmunes a los efectos tóxicos de la PrP<sup>sc</sup>, incluso cuando reciben altos títulos de PrP<sup>sc</sup> intracerebral (Ma *et al.*, 2002). Estudios recientes sugieren que la PrP<sup>sc</sup> es altamente tóxica si se acumula en el citosol. Dicha acumulación puede hacer insuficiente los mecanismos celulares encargados de la degradación de proteínas aberrantes o anómalas e inducir la muerte celular por apoptosis. La propia acumulación citosólica de PrP<sup>sc</sup> puede ser suficiente para aumentar su transformación en PrP<sup>sc</sup> y favorecer su diseminación y propagación subsecuentes (Ma *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2003).

### **Signos clínicos.**

La BSE afecta a animales aproximadamente desde los 2 años de edad, pero la mayoría de los casos se describen en animales de 4 a 6 años (con un rango de 20 meses a 18 años). La presentación de signos clínicos no está asociada a estaciones o ciclos reproductivos. Tampoco hay predilección por raza ni sexo (Konold, 2003). Sin embargo la incidencia de animales afectados es mayor en vacas lecheras que en bovinos de carne lo que se debería a que es más frecuente la alimentación con concentrado en las lecherías que en los sistemas de engorda. El período de incubación de la enfermedad se ha establecido entre 2 a 8 años (O.I.E., 2000). La enfermedad clínica puede durar desde menos de 2 semanas hasta 1 año (Torres *et al.*, 2001).

Las BSE comienza de forma insidiosa y la progresión desde signos prodromales a signos clínicos puede tomar semanas a meses. El estrés del transporte, del parto o enfermedades concurrentes pueden precipitar el inicio y/o la progresión de la BSE (Konold, 2003). Los principales signos clínicos son neurológicos, destacándose cambios en el comportamiento (aprehensión, agresividad, nerviosismo e hipervigilancia), alteraciones

sensoriales (hiperestesia al tacto y a los ruidos, reacciones de pánico) y locomotoras (ataxia, caídas, postración, entre otras) (Castilla *et al.*, 2002).

Los animales afectados suelen rehusarse a entrar a la sala de ordeña o patear excesivamente durante la ordeña. En vacas secas los primeros signos pueden ser debilidad y descoordinación de los miembros posteriores. El prurito intenso, característico del Scrapie no se ha descrito en los bovinos, sin embargo en algunos de los casos de BSE se presenta actividad de rascado. Además los animales afectados a veces suelen permanecer con la cabeza baja, el cuello extendido y las orejas dispuestas hacia atrás (O.I.E., 2000). Otros signos que se mencionan son rechinar de dientes, temores, vocalización y lamido nasal excesivo, agitación de cabeza y cuello y movimientos de orejas intensos y asimétricos (Konold, 2003). También se ha descrito disminución de la rumia, bradicardia, pérdida de peso y baja en la producción láctea. Los animales afectados finalmente se caen y permanecen postrados. No se han detectado diferencias en las presentaciones clínicas de BSE en el curso de la epidemia en el Reino Unido y son muy similares también en los otros países afectados (O.I.E., 2000).

Existen algunas pruebas típicas para el diagnóstico clínico de la BSE que consisten en la prueba del “bang”, en que se hacen ruidos repentinos cerca del animal golpeando con un martillo un objeto metálico; la llamada “prueba del flash” en que en un ambiente oscuro, se expone al animal al flash de una cámara y la del “clipboard”, en que se abanica con una carpeta cerca de animal. El afectado responde a las pruebas con una clara hiperestesia, reaccionando a ellas con movimientos motores exagerados, bruscos y violentos. Al hacer que el animal baje o suba un peldaño, los afectados muestran movimientos exagerados y atáxicos. Además estos animales no muestran un acostumbamiento a estímulos repetidos, lo que si ocurre normalmente en animales sanos (Konold, 2003).

### **Anatomía patológica.**

La anatomía patológica de la BSE es muy parecida a la del Scrapie (Castilla *et al.*, 2002), histopatológicamente los cambios más notorios consisten en astrogliosis, vacuolización de la sustancia gris y formación de placas amieloides ocasionales (Torres *et al.*, 2001). La lesión patognomónica es la vacuolización del neuropilo de la sustancia gris y se pueden encontrar una

o múltiples vacuolas en el perikarion neuronal. La vacuolización se caracteriza por ser bilateral y simétrica y produce un cambio denominado “espongiforme”, que le da el nombre a la enfermedad (O.I.E., 2000). Los sitios blancos de vacuolización en el SNC en el caso de la BSE son el tracto solitario y el tracto trigémino y en el Scrapie afecta principalmente al núcleo dorsal del vago (Wells, 2003)

### **Diagnóstico.**

Hay diversas enfermedades, que muestran signos neurológicos, que se pueden confundir con la BSE. Entre los diagnósticos diferenciales se encuentran desórdenes metabólicos como cetosis, hipomagnesemia, hipocalcemia, encefalopatías hepáticas; enfermedades asociadas al transporte, enfermedades infecciosas como listeriosis, fiebre catarral maligna, enfermedad de Aujeszky y otras como tétanos, botulismo, tumores de cerebro o médula espinal, poliencefalomalacia, malformaciones del SNC y otras encefalopatías (Konold, 2003).

Dado el impacto económico y social de la BSE es necesario contar con métodos de diagnóstico rápidos y sensibles que permitan controlar estos agentes antes de que puedan representar un riesgo para la salud humana. Para determinar el estado de la BSE en un país se requiere una notificación acuciosa e investigación diagnóstica de los casos sospechosos, los cadáveres de los animales afectados deben ser sacrificados y destruidos completamente (O.I.E, 2000).

El diagnóstico de la BSE presenta una serie de problemas debidos a las peculiaridades de este tipo de enfermedad. A diferencia de virus y bacterias, los priones no inducen una respuesta inmune y la ausencia de ácido nucleico descarta el uso de métodos diagnósticos como el PCR. El diagnóstico de la BSE se basa principalmente en la detección de:

- las alteraciones histopatológicas producidas por la enfermedad
- la isoforma infectiva de la proteína del prión (PrP<sup>sc</sup>)
- la infectividad mediante bioensayos apropiados (Torres *et al.*, 2001).

Aún no se han desarrollado métodos para diagnosticar la enfermedad en animales vivos. Los métodos clásicos para el diagnóstico, que en la actualidad se utilizan en Chile, han sido la observación de signos clínicos, la histopatología y la inmunohistoquímica (S.A.G., 2003). Sin embargo, la baja sensibilidad de estos métodos y la ausencia de alteraciones histopatológicas antes de que aparezcan los signos clínicos los convierte en métodos de diagnóstico poco eficaces (Torres *et al.*, 2001). No se identifican cambios en pruebas hematológicas, bioquímicas o citológicas de sangre, orina o fluido cerebro espinal. Sin embargo, algunos estudios revelan que los niveles de ácido láctico y varios aminoácidos están significativamente alterados en la BSE lo que se atribuye a la respuesta de estrés exagerada observada. Los niveles de la proteína 14-3-3 no son distinguibles entre animales sanos e infectados (Konold, 2003).

Hoy en día internacionalmente se han descrito métodos diagnóstico tales como la inmunohistoquímica, la inmunotransferencia, el ELISA y la detección microscópica de fibrillas (SAF) (Grassi *et al.*, 2001). El uso de un método particular dependerá del objetivo con el que el diagnóstico va a ser aplicado en el contexto epidemiológico. El rango de propósitos se extiende desde la confirmación del diagnóstico en el control de la enfermedad epizootica hasta el “screening” de la población sana para el análisis de encubrimiento o enfermedad preclínica (O.I.E., 2000).

Para el análisis histopatológico la alta frecuencia de ocurrencia de vacuolización neuroparenquimatosa en ciertos núcleos anatómicos de la médula oblonga a nivel del óbex, ha proporcionado una opinión satisfactoria del establecimiento del diagnóstico en una única sección de la médula (O.I.E., 2000). Para este procedimiento el tejido cerebral debe ser removido lo más pronto posible después de la muerte del animal. Para la detección específica de la PrPsc se congela una sección que corresponde a un corte completo y coronal de la médula, caudal al óbex, cuidando de no dañar esta estructura. El resto de tejido nervioso es muestreado para el análisis histopatológico, se almacena en 4 a 6 litros de formol al 10% por 2 semanas y posteriormente es cortado en secciones coronales de la médula oblonga que son procesadas con parafina y posteriormente examinados al microscopio con tinción de hematoxilina-eosina en busca de los cambios espongiiformes característicos y de la vacuolización neuronal (O.I.E., 2000). Las EET son prototipos de cambios espongiiformes de

la materia gris, pero en algunas enfermedades producidas por priones ocurren cambios en la materia blanca. Se ha encontrado vacuolización del tejido nervioso en otras patologías. Se pueden producir cambios espongiiformes patológicos en enfermedades congénitas o heredadas en que existe alteración en el metabolismo de aminoácidos o desórdenes del almacenamiento lisosomal, en enfermedades metabólicas, tóxicas o infecciosas. En el caso de la BSE y el Scrapie, la distribución, naturaleza y severidad de las lesiones son controladas por el tipo de prión involucrado y el genotipo del hospedero. En Scrapie se presenta vacuolización del perikarion con mayor frecuencia que en BSE (Wells, 2003).

En el caso de muestras sospechosas, negativas o dañadas por auto lisis es importante utilizar un método de detección específico de la PrPsc. Uno de estos métodos es la inmunohistoquímica (IHC) que es un método más sensible que la histopatología y que puede detectar casos que se encuentran en los últimos meses de incubación, previo a los cambio de vacuolización. Este método consiste en la detección de la PrPsc mediante el uso de anticuerpos específicos en cortes de óbex fijados con formalina y embebido en parafina. Otro método para la detección específica de la PrPsc es el Western Blot que es igual de sensible que la IHC y que también utiliza anticuerpos específicos, además de técnicas de separación electroforética e inmunotransferencia. Una tercera técnica específica corresponde al inmuno ensayo enzimático (ELISA) que utiliza anticuerpos monoclonales específicos. Para estos dos últimos métodos se utiliza tejido nervioso (óbex) fresco o congelado. Son simples, rápidas y potencialmente más sensibles que la histopatología (O.I.E., 2000). Los anticuerpos para PrP utilizados en los diferentes métodos de inmunodiagnóstico, no distinguen entre la forma patológica y la normal por lo que las muestras necesitan, previamente, un tratamiento de digestión con proteasas. La obtención de anticuerpos específicos para PrPsc facilitaría el desarrollo de métodos de detección más sensibles y específicos que los descritos. Otra posibilidad de diagnóstico es la amplificación *in vitro* de la PrPsc a partir de tejidos de los afectados (Collinge, 1999).

También se describe como método diagnóstico la detección de fibrillas asociadas a Scrapie (SAF) en que se utiliza la microscopía electrónica en extractos detergentes de tejido cerebral o de médula espinal fresca o congelada. Este método es particularmente útil cuando existe descomposición *post mortem* que dificulta el análisis histopatológico. Sin embargo, este método no tiene la especificidad de la IHC o de los métodos rápidos (O.I.E., 2000).



En 1999 la Comisión Europea evaluó 4 pruebas inmunológicas específicas para el diagnóstico *post mortem* de la BSE. Tres de éstas (CEA, Prionics y Enfer Scientific) fueron aprobadas, pero la cuarta (E.G. & Wallac) fue pospuesta para la siguiente reevaluación (Moynagh *et al.*, 1999). Estas 4 pruebas aprobadas para el muestreo de BSE también están recomendadas por las autoridades de la Unión Europea y utilizadas para el muestreo de pequeños rumiantes (Buschmann *et al.*, 2004).

La prueba desarrollada por el CEA (Comisionado de Energía Atómica de Francia) que se comercializa en forma de “kits” por Bio-Rad (Francia), consiste en un ELISA (inmunoensayo enzimático) de tipo “sandwich” que detecta la proteína priónica patógena mediante el uso de 2 anticuerpos monoclonales, uno de ellos unido a peroxidasa. La inmunoreacción se completa con la adición de un sustrato y un cromógeno para la posterior medición de densidad óptica (D.O). La detección se realiza en muestras previamente purificadas y tratadas con proteinasa K. La prueba de Prionics (Suiza) se basa en la electroinmunotransferencia (Western Blot) para la detección de la PrPsc. Además se ha desarrollado otra prueba en base a ELISA de quimioluminiscencia (Enfer Scientific Irlanda) (Moynagh *et al.*, 1999). Las pruebas diagnósticas mencionadas se denominaron “pruebas rápidas” debido al corto plazo en que se obtienen sus resultados. Los métodos diagnósticos que utilizan la técnica de ELISA se demoran alrededor de 4 h en obtener resultados, mientras que el método de Western Blot demora entre 6 a 8 h. Desde la aprobación de estos 3 métodos de diagnóstico por la Comisión Europea han sido aprobadas otras pruebas, que utilizan métodos similares a las anteriores (Grassi *et al.*, 2001). Los métodos de SAF-inmunoblot y de inmunohistoquímica están aprobados por la O.I.E. como métodos confirmatorios. Acorde a la legislación europea (regulación Unión Europea 1999/2001) las pruebas rápidas están aprobados para el “screening” de muestras de cerebro. En caso de un resultado reactivo la muestra debe ser examinada en el laboratorio de referencia nacional de cada país usando uno de los métodos confirmatorios aprobados por la O.I.E. (Buschmann *et al.*, 2004).

Existe un estudio en que se describe un procedimiento que involucra una amplificación cíclica de proteínas que permite una conversión rápida de PrPc en PrPsc, a partir de pequeñas cantidades de PrPsc. Aunque este estudio aún es pionero es importante destacar su futura utilidad en los métodos de diagnóstico de las EET, entre ellas la BSE (Saborio *et al.*, 2001).

Los resultados obtenidos durante el estudio realizado por la Comisión Europea (Julio, 1999) mostró en la prueba de ELISA de Bio-Rad una detección de un 100% de sensibilidad de muestras de animales estudiadas. Hallazgos en series de diluciones de muestras infectadas demostraron que, en promedio, la prueba es capaz de detectar cantidades de PrPsc por lo menos 1.000 veces más bajos que los observados en la fase clínica. Esto es un buen augurio para la detección temprana de la enfermedad. De todos modos, de las 4 pruebas evaluadas por esta comisión (todas las cuales se basan en la detección de la PrPsc), la prueba de ELISA de Bio-Rad/CEA resulta la más sensible y es también la que probablemente realiza el diagnóstico más tempranamente (Moynagh *et al.*, 1999). Esta prueba detecta 0,1 unidad infecciosa en ensayos biológicos con ratones. Es la primera vez que la sensibilidad de una prueba bioquímica o inmunológica es comparable con una prueba de infección experimental (Grassi *et al.*, 2001). Acorde con los resultados detallados en el archivo científico de la Comisión Europea, esta prueba posee una alta especificidad (100%) lo cual es muy importante cuando se quiere diagnosticar una enfermedad con muy baja incidencia (Moynagh *et al.*, 1999). La región anatómica más conveniente para la detección de PrPsc en bovinos infectados es el tronco encefálico, más precisamente la región del óbex de los núcleos del nervio vago y el tracto solitario, en que se han encontrado la mayor cantidad de PrPsc (Bio-Rad, 2003).

Las pruebas rápidas son muy utilizadas para el muestreo de animales en las etapas tardías (los últimos meses) de incubación, por ejemplo en estudio de material *post mortem* recolectado de rutina de mataderos. Tanto en los países que realizan estudios para la detección de nueva ocurrencia de BSE como para aquellos en que se estudia la prevalencia, estas pruebas desarrolladas ofrecen un método eficiente (O.I.E., 2000). Desde el 2002 las pruebas rápidas han sido utilizados para el monitoreo activo de Scrapie en rebaños ovinos de los países de la Unión Europea. Se demostró en un estudio de detección de Scrapie, que de las 4 pruebas rápidas el ELISA desarrollado por CEA y comercializado por Bio-Rad es el más certero en resultados, detectando correctamente todos los casos positivos. Sin embargo, con las otras 3 pruebas se obtuvieron falsos negativos y un número substancial de casos de Scrapie no fueron detectados. Este estudio se realizó utilizando los métodos confirmatorios aprobados por la O.I.E. (Buschmann *et al.*, 2004).

Hoy en día el uso de las harinas de carne y hueso, debido al peligro de transmisión de las EET, está prohibida en la alimentación bovina en muchos países y el análisis de los alimentos es crucial para la prevención de la BSE. Se utilizan diversos métodos para analizar alimentos en busca de proteína bovina. Dentro de estas pruebas se encuentran métodos inmunológicos, pruebas de ELISA, uso de biosensores, métodos electroforéticos, análisis de DNA y detección de priones, entre otros (Momcilovic y Rasooly, 2000).

En Chile los resultados preliminares de los diagnósticos histopatológicos realizados a la fecha y la ausencia del diagnóstico de la enfermedad clínica a nivel de campo, permiten decir que el país está libre de BSE y de Scrapie. La Unión Europea ha evaluado a Chile como un país con riesgo despreciable de tener un caso de BSE. Desde el inicio del problema en Europa Chile ha adoptado todas las medidas recomendadas por la Oficina Internacional de Epizootias (O.I.E.) y la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) para disminuir el riesgo de introducción de la enfermedad al país (S.A.G., 2003).

Dentro de las medidas adoptadas por el S.A.G. se encuentran:

- En 1990 se prohibió la importación de animales, productos y subproductos bovinos de riesgo de países con BSE.
- En 1991, se efectuó una evaluación del riesgo de BSE en el país, a objeto de demostrar la baja probabilidad de tener esta enfermedad en Chile.
- En 1996, se estableció a la BSE como enfermedad de notificación obligatoria.
- Entre 1996 y 1998 se recolectaron muestras de cerebro de 1.274 animales (bovinos, ovinos y caprinos) de todo Chile para el diagnóstico histopatológico de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), entre ellas BSE y Scrapie, de acuerdo a los procedimientos indicados por la O.I.E., cuyos resultados indicaron ausencia de enfermedades espongiformes transmisibles.
- En el año 2000, como medida sanitaria de extrema prevención, se ha prohibido la formulación, elaboración, distribución, venta y uso de alimentos y suplementos que contengan proteínas de origen mamífero, en la alimentación de rumiantes.
- En el 2001 se norma respecto a que las plantas que elaboran Harinas de Carne y Hueso (HCH) de rumiantes deben incorporar en sus procesos una temperatura de 133°C por 20 minutos como mínimo a una presión de 3 bar.

- Se modifican los requisitos sanitarios de importación de HCH de rumiantes, exigiéndose el mismo proceso antes indicado de temperatura, tiempos y presión.

El aumento de países con casos nativos de BSE en Europa a fines del 2000 e inicios del 2001 y la aparición del primer caso nativo en Canadá confirmado en mayo del 2003 ha cambiado el escenario de la BSE. La población ha mostrado estar muy sensible a los temas de las enfermedades animales y de la inocuidad de los alimentos que presentan peligro. Las principales medidas adicionales a las ya implementadas corresponden a:

- En el 2002 se establecen los requisitos de procesamiento en la elaboración de harinas de carne y hueso de origen rumiante que se incorporan en alimentos para mascotas.

- En el 2003 se suspende la internación de bovinos y productos de origen bovino desde Canadá.

- Como medida sanitaria preventiva se eliminó mediante sacrificio sanitario los 64 animales bovinos importados desde Dinamarca en 1998. Esta medida se ha considerado como de extrema precaución.

- Se ha perfeccionado el programa de contingencia sanitaria; en la eventualidad que se presentara un caso de BSE en Chile existe un plan de emergencia que permitirá minimizar los impactos que esta enfermedad provoca.

- Se solicitó apoyo internacional y se presentó a la F.A.O. un proyecto técnico orientado básicamente a:

- a) La contratación de un especialista de prestigio internacional para que evalúe las medidas y operación del S.A.G. en esta materia.

- b) Fortalecer el grado de experiencia de los profesionales y técnicos del SAG a través de programas de capacitación en el exterior.

- En este ámbito, en el año 2003 Chile participa como integrante y beneficiario del proyecto FAO de Cooperación Técnica “Evaluación y reforzamiento del sistema de prevención de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE) y el Sistema de Control de calidad de piensos”.

- Se han perfeccionado los niveles de coordinación y articulación internacional con los Servicios Oficiales del cono sur de Latinoamérica con el propósito de intercambiar y armonizar las medidas de prevención y protección del área. En este aspecto Chile forma parte de la Comisión Permanente sobre Encefalopatías Espongiformes Transmisibles de los animales (EET) en Sudamérica, de la Representación Regional de la O.I.E. para las Américas.

- Se han implementado nuevas técnicas de diagnóstico para la BSE en el Laboratorio Oficial del S.A.G. Además de la técnica de histopatología ya implementada, con el apoyo de PANAFTOSA, se implementó la técnica de Inmunohistoquímica. Lo anterior se ha complementado por pasantía de profesionales chilenos en varios laboratorios (España e Inglaterra) que participan del diagnóstico de la BSE en dichos países.  
(S.A.G., 2003).

Dentro de este último aspecto se enmarcan los objetivos de esta memoria de título que se basan, entre otras, en la evaluación de un método diagnóstico rápido, sensible y específico para la BSE, aprobado por la Comisión Europea y reconocido a nivel internacional, pero que aún no se ha implementado en nuestro país.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL:**

Detección de Encefalopatía Espongiforme Bovina mediante inmunoensayo enzimático (ELISA).

#### **V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Purificar y caracterizar proteínas priónicas a partir de cerebros de bovino.
- Describir las características inmunoreactivas de las proteínas priónicas mediante inmunoensayo enzimático (ELISA).
- Implementar un método de diagnóstico para la detección de proteínas priónicas.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

El trabajo experimental de esta memoria de título se desarrolló en parte en el laboratorio de Virología del subdepartamento Pecuario del Servicio Agrícola y Ganadero (S.A.G.), que cuenta con las normas de seguridad requeridas para trabajar con muestras de proteínas priónicas. La otra parte se realizó en el laboratorio del Centro de Biología y Biotecnología (CBB) del Instituto Milenio de Estudios Avanzados de la Universidad de Chile.

Dentro de las medidas de seguridad utilizadas, que son recomendadas por la O.I.E., se encuentran la utilización de ropa exclusiva para el trabajo de laboratorio, doble guantes desechables, guantes anticorte, mascarilla, gorro, pechera y gafas de seguridad. Para la desinfección del material utilizado se utilizó autoclavado a 134° C por 1 hora a 3 bar e hipoclorito de sodio. Todo el trabajo se realizó bajo campana de seguridad de doble flujo y con presión negativa, en un laboratorio específico y exclusivo para BSE. Los desechos se eliminaron por incineración.

Para la purificación y caracterización se utilizó un “pool” de muestras de tronco encefálico de bovinos destinados a consumo, provenientes de mataderos de la Región Metropolitana, negativas al examen histopatológico. Para la inmunodetección se utilizaron 45 muestras de iguales características. Del tronco encefálico se utilizó específicamente el óbex debido a que, según estudios internacionales, en esta región se encuentran los núcleos del sistema nervioso central (SNC) que mayoritariamente se ven afectados por la BSE. Para la obtención de muestras se seleccionaron animales mayores de 30 meses de edad, de acuerdo a lo establecido por la O.I.E., sin importar la raza ni el sexo. Una vez obtenidas las muestras se transportaron refrigeradas para posteriormente mantenerlas congeladas a -20°C en una cámara de congelación. Para la inmunodetección todas las muestras fueron procesadas en duplicado.

### **Purificación de proteínas priónicas.**

Las proteína priónica celular fue purificada de acuerdo al protocolo de purificación descrito por Diringer *et al.*, (1997) con algunas modificaciones.

Se tomaron 40 g de óbex a partir de un “pool” de troncos encefálicos, que se homogeneizaron (homogeneizador OMNI International) en 175 ml de una solución que contenía PBS (tampón fosfato salino) pH 7,4 con 10% sarcosyl. El homogeneizado se mantuvo por 30 min a temperatura ambiente y luego se filtró a través de gasa estéril. La solución resultante se centrifugó (Ultracentrífuga Sorvall 80) a 16.000 x g a 4°C por 15 min. Se recogió el sobrenadante, al cual se le añadieron 16 ml de EDTA (ácido Etilendiamino N,N,N',N'-tetracético) 0,1 M, pH 7,6 y se repartió en tubos que contenían 1 ml de sacarosa 20%. Se centrifugó a 145.000 x g a 4°C por 90 min. El “pellet” y las paredes de los tubos se lavaron con 1 ml de agua ajustada a pH 8,5 y se resuspendieron en 5 ml de tampón Tris-HCl (Tris-hidroximetil- aminometano) 20 mM pH 8,5, adicionado con Zwittergent en una concentración final de 0,1% (Tris-Zw). Las resuspensiones se combinaron para el siguiente paso obteniendo la mitad del volumen total de los tubos, que se llevó a un volumen final de 25 ml con el mismo tampón Tris-Zw pH 8,5 y se depositó en tubos que contenían 1 ml de sacarosa 20%. Se centrifugó la solución a 145.000 x g a 4°C por 1 h. Los “pellets” resultantes se solubilizaron en 5 ml de agua ajustada a pH 8,5, se llevaron a 25 ml con tampón Tris-Zw pH 8,5 y nuevamente se colocaron en tubos que contenían 1 ml de sacarosa 20%. Se centrifugó en idénticas condiciones y los “pellets” resultantes se resuspendieron, agregando a cada tubo una solución final de 6 ml de Tris 0,2 M pH 8,5, adicionado con MgCl<sub>2</sub> 1M, 10 µg RNAsa y 10 µg de benzonasa. La mezcla se incubó durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación constante posterior a lo cual se extrajeron las alícuotas para la caracterización.

### **Caracterización de proteínas priónicas.**

Para la caracterización de las proteínas priónicas la PrPc fue purificada en el laboratorio de Virología Pecuaria del S.A.G. y una proteína priónica recombinante (PrPrec) fue obtenida y facilitada en el laboratorio del Dr. Torres del CISA INIA, Madrid-España. La PrPrec se caracteriza por ser no infectiva y sensible a la digestión con proteinasa K Esta proteína



priónica recombinante se utilizó como un patrón patológico no infeccioso debido a que no fue posible contar con una muestra positiva para la caracterización de la PrPsc.

Las proteínas priónicas fueron caracterizadas a través de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) al 12% con SDS (dodecilsulfato de sodio) 0,2%, según lo descrito por Laemmli, (1970). Posteriormente se realizó una inmunotransferencia (Western Blot) para la inmunodetección de las proteínas.

Para cumplir con este objetivo se prepararon 2 minigeles de poliacrilamida (PAGE) al 12% con SDS 0,2%. Las muestras de proteínas priónicas se prepararon de la siguiente manera:

- 1) 3  $\mu$ l de estándar de peso molecular preteñido con rango de pesos moleculares conocidos.
- 2) alícuotas de 20  $\mu$ l de la muestra resultante de purificado.
- 3) alícuotas de 20  $\mu$ l de la muestra de purificado tratada con 2  $\mu$ l de proteinasa K (en una concentración de 20  $\mu$ g/ml), previamente sometidas a una incubación de 37°C por 40 min.
- 4) alícuotas de 20  $\mu$ l de PrPrec
- 5) alícuotas de 20  $\mu$ l de PrPrec con 2  $\mu$ l de proteinasa K y se incubaron previamente a 37° C por 40 min.

A cada muestra se le agregaron 6  $\mu$ l de buffer de carga, se centrifugaron a 15.000 x g por 1 min y se sometieron a baño maría a 100° C por 5 min. Las muestras así obtenidas se distribuyeron en los pocillos de los PAGE al 12 % de la siguiente manera:

|   |                 |
|---|-----------------|
| 3 $\mu$ l del estándar preteñido          | pocillos 1 y 6  |
| 10 $\mu$ l de purificado                  | pocillos 2 y 7  |
| 10 $\mu$ l de purificado con proteinasa K | pocillos 3 y 8  |
| 10 $\mu$ l de PrPrec                      | pocillos 4 y 9  |
| 10 $\mu$ l de PrPrec con proteinasa K     | pocillos 5 y 10 |

La distribución y las cantidades de proteínas se mantuvieron en todos los geles, los que fueron sometidos a 120 V por 80 min. Transcurrido este tiempo la mitad de cada uno de los geles se sometió a tinción con azul de Coomassie para el análisis e identificación de los

patrones electroforéticos de cada una de las proteínas en estudio, para lo cual los geles fueron desteñidos y fotografiados para su registro.

Por otra parte, con la otra mitad de cada gel se realizó la transferencia a membranas de polividileno difluoride (PVDF), según lo descrito por Burnette (1981). Este método se basa en la transferencia de las proteínas desde los geles PAGE a las membranas y se realiza a 0,4 A° por 1 hora. Una vez finalizada, las membranas se bloquearon 1 hora en una solución de leche bovina descremada al 5% en TBST (tris buffer salino al 0,1% pH 7,4 y Tween 20 polyoxyethylene-sorbitan-monolaurate 0,1% a T° ambiente. Posteriormente las membranas se enjuagaron 2 veces con TBST y luego cada una se incubó con el de anticuerpo primario monoclonal (6H4 IgG1 ratón), solubilizado en TBST en una dilución de 1:1000 y se mantuvieron toda la noche a 4° C en agitación constante. Concluido este tiempo las membranas se lavaron primero por 15 minutos y luego 3 veces por 5 min con TBST. Se agregó a las membranas el anticuerpo secundario policlonal (IgG cabra anti ratón antiprión) conjugado con peroxidasa, solubilizado en TBST en una dilución de 1:4000 y se incubó a T° ambiente por 1 hora, realizando posteriormente lavados idénticos a los anteriores. Finalmente las membranas se sometieron a revelado manual, agregando a las membranas, en oscuridad, 1 ml de ECL (sustrato de peroxidasa). Se expusieron por 1 minuto en una placa radiográfica, posterior a lo cual se revelaron.

### **Detección de proteínas priónicas mediante inmunoensayo.**

Para este paso se utilizó un “kit” comercial basado en una prueba de ELISA (TeSeE, Bio-Rad). Este “kit” consta de 2 partes, una primera parte de purificación de muestras para la obtención de PrPsc y una segunda de detección inmunoenzimática en microplaca (ELISA). Se utilizaron 45 muestras obtenidas de tronco encefálico de bovinos destinados a consumo, las que fueron procesadas en duplicado.

#### **1. Purificación.**

- Muestreo: Para la purificación de cada muestra se tomaron 350 +/- 40 mg de óbex que se depositaron en tubos de trituración.

- Trituración: En esta etapa las muestras depositadas en los tubos de trituración (que contienen bolitas de cerámica) fueron sometidas a 2 ciclos de 45 seg de agitación para lo cual se utilizó un vórtex. Entre ambos ciclos se realizó una centrifugación a 10.000 x g por 1 min.

- Calibración: Se tomaron 250 µl de la solución de cada triturado, que se traspasaron a tubos Eppendorf de polipropileno. Este paso se realizó en duplicado para cada muestra, con lo que se obtuvieron un total de 90 tubos Eppendorf, con 250 µl de solución de triturado en cada uno. Los restos de triturado se guardaron a -20° C.

- Tratamiento con proteinasa K: En cada tubo se agregó 250 µl de una solución reconstituida de proteinasa K (tampón A solución de desnaturalización + proteinasa K) y se homogeneizaron con la solución de triturado contenida en los tubos. Posteriormente se incubaron a 37° C por 10 min.

- Precipitación: Luego de la incubación a cada tubo se adicionaron 250 µl de tampón B (solución de precipitación + azul de bromofenol) y se homogeneizaron hasta obtener un color azul homogéneo en todos los tubos, los que posteriormente se centrifugaron a 12.000 x g a 20° C por 9 min.

- Aclaración de la muestra: Finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante y los tubos se invirtieron sobre papel absorbente por 5 min. Se le adicionaron 25 µl de tampón C (tampón de solubilización), se incubaron en baño maría a 100° C por 5 min y se homogeneizaron nuevamente todos los tubos. De esta manera se obtuvieron soluciones uniformes para cada muestra en estudio con las cuales se desarrolló la detección de PrPsc por inmunoensayo (ELISA).

## **2. Detección.**

Para la detección mediante inmunoensayo (ELISA) tipo “sandwich” se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos, recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-PrP. Este anticuerpo reconoce tanto la PrPc como la PrPsc por lo que es imprescindible trabajar con muestras previamente purificadas. Se utilizaron 90 tubos para las 45 muestras previamente purificadas, de acuerdo a lo descrito anteriormente. Para esta etapa se preparó el control positivo, añadiendo a un tampón de PBS pH 7,4 un péptido sintético no infeccioso. Para el control negativo se utilizó tampón PBS pH 7,4 suplementado con albúmina sérica bovina

(BSA) que se encuentra preparado para su uso directo. Todas las muestras purificadas se diluyeron agregando a cada tubo 125 µl de tampón PBS pH 7,2, suplementado con BSA y rojo fenol y se agitaron por 5 seg en vórtex para homogeneizar. En la microplaca se procedió a la distribución de 100 µl por pocillo de los controles, cuatro negativos y dos positivos, así como también 100 µl por pocillo de las muestras en el orden que se describe en la Tabla N° 3:

**Tabla N° 3: Distribución de las muestras purificadas en la microplaca.**

|          | 1     | 2  | 3  | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  |
|----------|-------|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b>A</b> | C neg | M2 | M6 | M10 | M14 | M18 | M22 | M26 | M30 | M34 | M38 | M42 |
| <b>B</b> | C neg | M2 | M6 | M10 | M14 | M18 | M22 | M26 | M30 | M34 | M38 | M42 |
| <b>C</b> | C neg | M3 | M7 | M11 | M15 | M19 | M23 | M27 | M31 | M35 | M39 | M43 |
| <b>D</b> | C neg | M3 | M7 | M11 | M15 | M19 | M23 | M27 | M31 | M35 | M39 | M43 |
| <b>E</b> | C pos | M4 | M8 | M12 | M16 | M20 | M24 | M28 | M32 | M36 | M40 | M44 |
| <b>F</b> | C pos | M4 | M8 | M12 | M16 | M20 | M24 | M28 | M32 | M36 | M40 | M44 |
| <b>G</b> | M 1   | M5 | M9 | M13 | M17 | M21 | M25 | M29 | M33 | M37 | M41 | M45 |
| <b>H</b> | M 1   | M5 | M9 | M13 | M17 | M21 | M25 | M29 | M33 | M37 | M41 | M45 |

C neg= control negativo; C pos =control positivo; M= muestra.

Una vez finalizada la distribución de las muestras en toda la microplaca se cubrió con una película adhesiva y se incubó a 37° C por 75 min en estufa de cultivo. Se retiró la película adhesiva, se eliminó el contenido y se dispuso la microplaca invertida sobre un papel absorbente para descartar todo el líquido de los pocillos. Luego se realizaron 3 ciclos de lavado, agregando cada vez 300 µl por pocillo de una solución de lavado (tampón Tris-NaCl pH 7,4) que se mantuvo en contacto por 45 seg para luego descartar el líquido por inversión de la microplaca por 5 seg sobre papel absorbente. Se distribuyeron 100 µl por pocillo de la solución de conjugado, que contiene el segundo anticuerpo monoclonal anti PrP conjugado con peroxidasa. La microplaca se cubrió con película adhesiva y se incubó a 4° C por 60 min. Posterior a la incubación se descartó el líquido y se realizaron 5 ciclos de lavado idénticos a los descritos anteriormente. Se distribuyeron 100 µl por pocillo de una solución de revelado que contiene ácido cítrico más acetato de sodio a pH 7,4 adicionado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,015% y dimetilsulfóxido al 4% (DMSO) más el cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB). Se incubó

nuevamente la microplaca a temperatura ambiente en oscuridad por 30 min. En esta etapa los controles positivos y las posibles muestras positivas se tornan de un color azul. Después de la incubación se detuvo la reacción agregando 100 µl por pocillo de solución de parada (ácido sulfúrico 1N), en la misma secuencia de distribución de la solución de revelado. En este paso los controles positivos y las posibles muestras positivas cambian del color azul al amarillo. Transcurridos 7 minutos se procedió a determinar la inmunoreacción en un lector de ELISA a una longitud de onda de 450 nm a través de la medición de su densidad óptica (D.O.). Posteriormente, en base a los valores promedios de D.O., se analizaron e interpretaron los resultados de las muestras, calificándolas como positivas, negativas o sospechosas según lo descrito por Bio-Rad (Bio-Rad, 2003).

### **Validación de la placa.**

Las condiciones que validan este ensayo están establecidas por Bio-Rad y se resumen como sigue:

◆ Controles negativos:

a) Para la validación de los valores individuales del control negativo es necesario que todos los valores de lectura obtenidos para estos sean inferiores a 0,150 unidades de D.O.. Sin embargo, de acuerdo a las recomendaciones se podría eliminar como máximo un valor de lectura individual si la D.O. de este es superior a 0,150 unidades de D.O. y se debería repetir la prueba si más de uno de los valores de los controles negativos utilizados sobrepasa las 0,150 unidades de D.O.

b) Homogeneidad de los valores de los controles negativos. Para verificar la homogeneidad de los controles negativos se calcula una media de las lecturas de densidad óptica de estos controles. La densidad óptica media de los controles negativos es igual a la media de los 4 valores de lectura de D.O. de los controles negativos. Para que exista una homogeneidad entre los valores de lectura de D.O. de los controles negativos, estos valores no deben superar en más de un 40% a la media de D.O. de los controles negativos. Los controles negativos que superan este porcentaje deben ser eliminados. Si se ha eliminado un control negativo en la validación, se puede descartar sólo un control negativo en la homogeneidad. Sin embargo, si no se ha eliminado ningún control negativo en la primera parte (a), se pueden descartar hasta

dos controles negativos en la segunda parte (b). El ensayo se debería repetir cuando más de dos valores de los controles negativos deban ser descartados en cualquiera de las condiciones requeridas para obtener la homogeneidad o la validación de los controles negativos según lo descrito anteriormente.

◆ Controles positivos.

Para que el ensayo que se realiza sea válido se requiere que al menos uno de los valores de los controles positivos sea superior o igual a 1,000 unidad de D.O. en la lectura. Por lo cual la prueba debería repetirse por completo si los dos valores de los controles positivos son menores a 1,000 unidad de D.O. en su lectura.

**Interpretación de los resultados.**

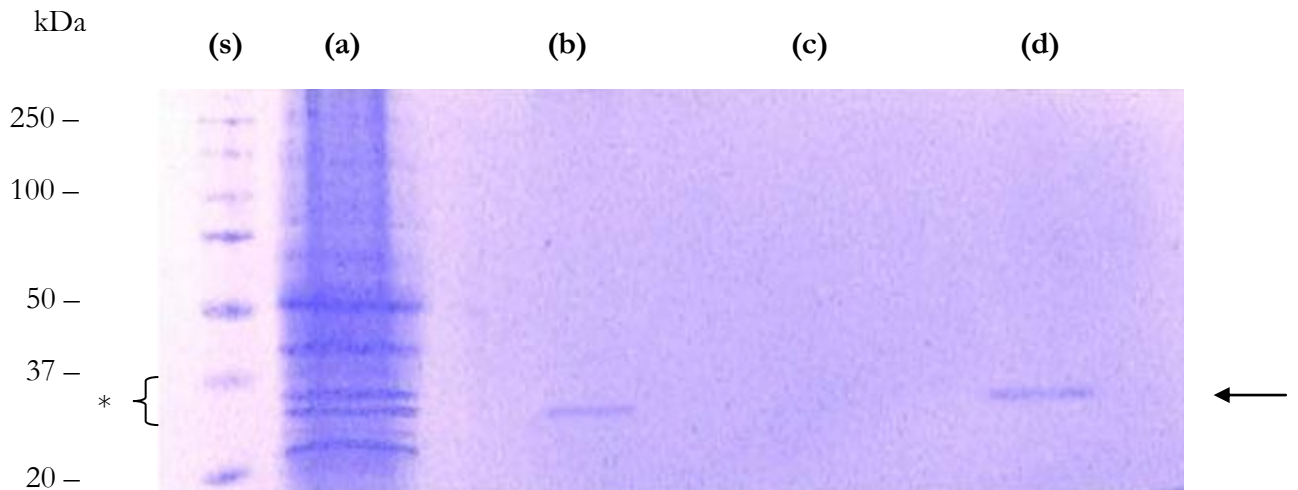
Para calificar las muestras analizadas como positivas, negativas o sospechosas es necesario calcular el valor umbral (V.U.). Este valor se calcula sumando la lectura media de la D.O. de los controles negativos + un valor constante que corresponde a 0,210.

Las exigencias del “kit” de detección TeSeE utilizado en esta memoria indican que las muestras cuya lectura de D.O. sea inferior al valor umbral calculado se consideran negativas. Por otra parte se requiere que los resultados que se sitúan justo por debajo del valor umbral (valor umbral – 10%) deberán interpretarse con precaución (sospechosas) y se recomienda que se vuelvan a estudiar las muestras correspondientes por duplicado. Las muestras cuya D.O. sea mayor o igual al valor umbral se consideran inicialmente reactivas (positivas) según este ensayo de detección y se deben volver a estudiar por duplicado antes de la interpretación final. Después de repetir la prueba se considera que la muestra es positiva, según este “kit” de detección, cuando al menos una de las lecturas de D.O. sea positiva, es decir, mayor o igual al valor umbral. Se considera que la muestra es negativa cuando los dos valores de lectura de D.O. sean menores al valor umbral. Las muestras repetidas por duplicado y que resulten negativas según este “kit” de detección, pero en las cuales uno de los valores de lectura esté próximo al valor umbral (valor umbral – 10%) deberán interpretarse con precaución.

## VII. RESULTADOS:

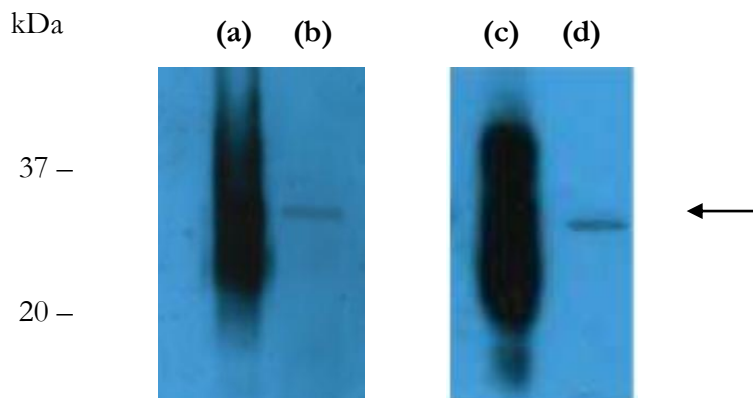
### 1.- Purificación y caracterización:

Una vez finalizada la electroforesis, en las mitades de geles PAGE que se tiñeron con azul de Coomassie se obtuvieron 4 patrones diferentes. Como se observa en la figura N° 1, en la primera línea de corrida, a un lado del estándar de peso molecular, se identifican varias proteínas del SNC entre las cuales se encuentra la proteína priónica celular (PrPc) con un peso molecular de 33 a 35 kDa (a), que luego fue caracterizada por Western Blot. En la segunda se observa una banda proteica con un peso molecular de 31 kDa que corresponde a la proteinasa K (b). En este lugar del gel fue puesta la PrPc sometida a digestión, pero ésta no se observa. En la tercera línea fue puesta la proteína priónica recombinante (PrPrec), sin embargo esta proteína en el gel teñido no se observa debido a que se encuentra en muy baja concentración (c). En la cuarta línea del gel se observa nuevamente una banda proteica de la proteinasa K, de 31 kDa, y tampoco se observa la PrPrec que fue cargada en este lugar del gel.



**Figura N° 1. Electroforesis de proteínas priónicas en PAGE SDS 12%.** (s) estándar de peso molecular; (a) proteína priónica celular (PrPc) \* indica las bandas correspondientes; (b) PrPc tratada con proteinasa K; (c) proteína priónica recombinante (PrPrec); (d) PrPrec tratada con proteinasa K. La flecha indica los 31 kDa en que se ubican las bandas de proteinasa K.

Posterior a la transferencia de los geles y al revelado de las membranas se obtuvieron las placas radiográficas. En éstas, tal como en los geles, se identifican los 4 patrones. En la figura N° 2 se observa, en la primera línea de corrida (a) sólo la PrPc, detectada por el anticuerpo monoclonal específico para PrP con un peso molecular entre 33 a 35 kDa. En la segunda línea (b) se visualiza sólo una banda en los 31 kDa que corresponde a la proteinasa K. En este caso el anticuerpo primario no detectó la PrPc ya que ésta fue digerida. En la tercera línea (c) se observa la PrPrec que fue detectada por el anticuerpo monoclonal con un peso molecular entre los 33 a 35 kDa. En la cuarta línea de la transferencia (d) se identifica nuevamente la banda proteica de la proteinasa K, de 31 kDa, que es detectada por el anticuerpo secundario, mientras que la PrPrec no se observa ya que fue digerida por la enzima.



**Figura N° 2. Inmunotransferencia de proteínas priónicas.** (a) proteína priónica celular (PrPc); (b) PrPc tratada con proteinasa K;(c) proteína priónica recombinante (PrPrec); (d) PrPrec tratada con proteinasa K. La flecha indica los 31 kDa en que se ubican las bandas de proteinasa K.



## 2.- Inmunodetección:

En la Tabla N° 4 se muestran las lecturas de densidad óptica (D.O.) obtenidas en cada muestra que se registraron en los ensayos en microplaca y que se realizaron en duplicado.

**Tabla N° 4: Lectura de la D.O. de la inmunoreacción de las muestras en cada pocillo de la microplaca. (A - 450 nm).**

|          | 1              | 2           | 3           | 4             | 5             | 6            | 7            | 8            | 9            | 10           | 11           | 12           |
|----------|----------------|-------------|-------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>A</b> | C neg<br>0,035 | M2<br>0,055 | M6<br>0,085 | M10<br>0,068  | M14<br>0,048  | M18<br>0,038 | M22<br>0,042 | M26<br>0,036 | M30<br>0,041 | M34<br>0,046 | M38<br>0,042 | M42<br>0,043 |
| <b>B</b> | C neg<br>0,035 | M2<br>0,049 | M6<br>0,049 | M10<br>0,064  | M14<br>0,052  | M18<br>0,044 | M22<br>0,042 | M26<br>0,036 | M30<br>0,055 | M34<br>0,046 | M38<br>0,046 | M42<br>0,046 |
| <b>C</b> | C neg<br>0,038 | M3<br>0,056 | M7<br>0,052 | M11*<br>0,126 | M15<br>0,052  | M19<br>0,040 | M23<br>0,040 | M27<br>0,070 | M31<br>0,058 | M35<br>0,070 | M39<br>0,091 | M43<br>0,047 |
| <b>D</b> | C neg<br>0,037 | M3<br>0,050 | M7<br>0,068 | M11<br>0,054  | M15<br>0,039  | M19<br>0,059 | M23<br>0,043 | M27<br>0,042 | M31<br>0,043 | M35<br>0,051 | M39<br>0,048 | M43<br>0,046 |
| <b>E</b> | C pos<br>1,134 | M4<br>0,043 | M8<br>0,045 | M12<br>0,064  | M16<br>0,082  | M20<br>0,067 | M24<br>0,069 | M28<br>0,100 | M32<br>0,049 | M36<br>0,063 | M40<br>0,051 | M44<br>0,093 |
| <b>F</b> | C pos<br>1,292 | M4<br>0,044 | M8<br>0,043 | M12<br>0,040  | M16*<br>0,222 | M20<br>0,038 | M24<br>0,037 | M28<br>0,090 | M32<br>0,050 | M36<br>0,053 | M40<br>0,070 | M44<br>0,051 |
| <b>G</b> | M 1<br>0,058   | M5<br>0,041 | M9<br>0,066 | M13<br>0,052  | M17<br>0,046  | M21<br>0,085 | M25<br>0,040 | M29<br>0,049 | M33<br>0,049 | M37<br>0,053 | M41<br>0,055 | M45<br>0,043 |
| <b>H</b> | M 1<br>0,044   | M5<br>0,037 | M9<br>0,040 | M13<br>0,084  | M17<br>0,060  | M21<br>0,055 | M25<br>0,042 | M29<br>0,045 | M33<br>0,050 | M37<br>0,053 | M41<br>0,050 | M45<br>0,092 |

C neg= control negativo; C pos =control positivo; M= muestra.

\* valores de densidad óptica más cercanos al valor umbral.

Para el análisis de los resultados se calculó el promedio entre los dos valores de lectura de la D.O. obtenidos con la inmunoreacción de cada una de las muestras. Los promedios por muestra se presentan en la Tabla N° 5.

**Tabla N° 5. Valores promedios de D.O. de la inmunoreacción de cada una de las muestras.**

| <b>MUESTRA</b> | <b>D.O. (prom.)</b> | <b>MUESTRA</b> | <b>D.O. (prom.)</b> |
|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| M 1            | 0,051               | M 2            | 0,052               |
| M 3            | 0,053               | M 4            | 0,044               |
| M 5            | 0,039               | M 6            | 0,067               |
| M 7            | 0,060               | M 8            | 0,044               |
| M 9            | 0,035               | M 10           | 0,066               |
| M 11           | 0,090               | M 12           | 0,052               |
| M 13           | 0,068               | M 14           | 0,050               |
| M 15           | 0,046               | M 16           | 0,152               |
| M 17           | 0,053               | M 18           | 0,041               |
| M 19           | 0,050               | M 20           | 0,053               |
| M 21           | 0,070               | M 22           | 0,042               |
| M 23           | 0,042               | M 24           | 0,053               |
| M 25           | 0,041               | M 26           | 0,036               |
| M 27           | 0,056               | M 28           | 0,095               |
| M 29           | 0,047               | M 30           | 0,048               |
| M 31           | 0,051               | M 32           | 0,050               |
| M 33           | 0,050               | M 34           | 0,046               |
| M 35           | 0,061               | M 36           | 0,058               |
| M 37           | 0,053               | M 38           | 0,044               |
| M 39           | 0,070               | M 40           | 0,061               |
| M 41           | 0,053               | M 42           | 0,045               |
| M 43           | 0,047               | M 44           | 0,072               |
| M 45           | 0,068               |                |                     |

En el ensayo inicial, el promedio de los valores de D.O. de todas las muestras (en duplicado) fue de 0,056 unidades de D.O..

### **Validación de la placa.**

◆ Controles negativos:

En este ensayo los valores de los controles negativos corresponden a:

D.O Control negativo 1A = 0,035 unidades

D.O Control negativo 1B = 0,035 unidades

D.O Control negativo 1C = 0,038 unidades

D.O Control negativo 1D = 0,037 unidades

Como se puede observar en este ensayo los valores de lectura para la inmunoreacción de cada uno de los controles negativos son menores a 0,150 unidades de densidad óptica por lo que no fue necesario descartar ningún valor.

Para verificar la homogeneidad de los controles negativos se calculó una media de las lecturas de densidad óptica de estos controles.

$$\frac{A1 + B1 + C1 + D1}{4} = \frac{0,035 + 0,035 + 0,038 + 0,037}{4} = 0,03625 \text{ (D.O. media)}$$

Para que exista una homogeneidad entre los valores de lectura de D.O. de los controles negativos, estos valores no deben superar en más de un 40% a la media de D.O. de los controles negativos. Así el resultado para este ensayo resulta ser:

$$0,03625 + 0,0145 = 0,0507 \text{ D.O.}$$

En esta prueba todos los valores de D.O. de los controles negativos fueron inferiores a 0,0507 unidades de D.O., por lo tanto, en este caso existe una completa homogeneidad de los valores de los controles negativos y no fue necesario descartar ninguno de los valores obtenidos.

◆ Controles positivos.

El este ensayo, se obtuvieron las siguientes lecturas de controles positivos: primer control positivo E1: 1,134 unidades de D.O., y para el segundo control positivo F1: 1,292 unidades de D.O. Por lo tanto, en el ensayo realizado ambos valores de los controles positivos fueron superiores a 1,000 unidad de D.O. lo cual indica que este requerimiento también fue cumplido.

**Interpretación de los resultados.**

El valor umbral es igual a la lectura media de la D.O. de los controles negativos + 0,210  
Para este caso  $V.U. = 0,03625 + 0,210 = 0,24625$  D.O.

En este estudio el valor límite considerado se calculó de acuerdo a  $V.U - 10 \%$ , es decir con los valores reales obtenidos corresponde a:

$$0,24625 - 0,0246 = 0,2217 \text{ unidades de D.O. de lectura (valor límite).}$$

De esta forma, el valor de lectura de D.O. obtenido para uno de los duplicados de la muestra 16 fue superior al valor límite, por lo que se considera sospechosa. A su vez para la muestra 11, en uno de los duplicados, se obtuvo una lectura de D.O. muy cercana al valor límite, considerándola también sospechosa. Por esta razón se repitió el ensayo para estas dos muestras.

Por otra parte, se puede concluir que el resto de las muestras analizadas, en primera instancia, resultaron ser negativas por tener un valor de lectura inferior a 0,2217 unidades de D.O. Así, en el estudio inicial, de las 45 muestras estudiadas, 43 (95,6%) fueron consideradas negativas y 2 (4,4%) fueron sospechosas. Estos resultados se resumen en la tabla N° 6.

**Tabla N° 6: Resultados del ensayo inicial.**

|                      |    |
|----------------------|----|
| Muestras totales     | 45 |
| Muestras positivas   | 0  |
| Muestras sospechosas | 2  |
| Muestras negativas   | 43 |

La especificidad corresponde a la capacidad para identificar animales sanos correctamente. Con estos valores, tomando en cuenta que las muestras utilizadas son negativas a la histopatología y que nuestro país es libre de BSE, se pudo calcular una especificidad en las condiciones en que se realizó este ensayo de un 95,6%, siendo importante destacar que este valor corresponde exclusivamente a este ensayo y no representa la especificidad de la prueba diagnóstica o del “kit” utilizado. La sensibilidad (capacidad para identificar animales infectados correctamente) no se pudo obtener para este ensayo debido a que no se obtuvieron muestras positivas.

Los valores de D.O. obtenidos en la repetición de las muestras 11 y 16 se muestran en la Tabla N° 7.

**Tabla N° 7. Valores de D.O. para muestras 11 y 16.**

| <b>MUESTRA</b>        | <b>D.O.</b> | <b>MUESTRA</b>        | <b>D.O.</b> |
|-----------------------|-------------|-----------------------|-------------|
| C neg. 1A             | 0,035       | C neg. 1B             | 0,034       |
| C neg. 1C             | 0,034       | C neg. 1D             | 0,036       |
| C pos. 1E             | 1,262       | C pos. 1F             | 1,316       |
| M11                   | 0,051       | M16                   | 0,042       |
| M11                   | 0,047       | M16                   | 0,048       |
| D.O. promedio<br>M 11 | 0,049       | D.O. promedio<br>M 16 | 0,045       |

C neg= control negativo; C pos =control positivo; M= muestra.

Para calificar estas muestras fue necesario validar nuevamente la placa. De este modo:

◆ Controles negativos:

D.O. control negativo 1A: 0,035

D.O. control negativo 1B: 0,034

D.O. control negativo 1C: 0,034

D.O. control negativo 1D: 0,036

Como se puede observar, todos los valores de lectura para cada uno de los controles negativos son menores a 0,150 unidades de D.O. por lo que no fue necesario descartar ningún valor.

Homogeneidad de los valores de los controles negativos:

$$\frac{A1 + B1 + C1 + D1}{4} = \frac{0,035 + 0,034 + 0,034 + 0,036}{4} = 0,03475$$

Así en este ensayo la D.O. de los controles negativos + un 40 % resulta ser:

$$0,03475 + 0,0139 = 0,04865$$

En esta prueba todos los valores de D.O. de los controles negativos fueron inferiores a 0,04865 unidades de D.O., por lo tanto existe una completa homogeneidad de los valores de los controles negativos y no fue necesario descartar ninguno de los valores obtenidos.

◆ Controles positivos:

En el caso de este ensayo se obtuvieron lecturas en el primer control positivo E1: 1,262 unidades de D.O., y para el segundo control positivo F1: 1,316 unidades de D.O. Por lo tanto en el ensayo realizado ambos valores de los controles positivos fueron superiores a 1,000 unidad de D.O., lo cual indica que este requerimiento también se cumple.

### **Interpretación de los resultados.**

Para este caso  $V.U. = 0,03475 + 0,210 = 0,24475$

El valor límite corresponde a:  $0,24475 - 0,024475 = 0,2203$  unidades de D.O.

Los valores de lectura de D.O., tanto de la muestra 11 como de la 16, se sitúan por debajo del valor límite, por lo tanto se consideran negativas. De esta forma las 45 muestras analizadas resultaron negativas.

## VIII. DISCUSIÓN.

En el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie obtenido en este estudio, en la línea de corrida de la muestra purificada de cerebro de bovino se observan las bandas de la PrPc entre los 33 a 35 kDa. Sin embargo, además fue posible visualizar otras bandas de proteínas lo cual se debería a que si bien, mediante el protocolo de purificación utilizado se denaturaron gran parte de las proteínas presentes en el tejido nervioso, este protocolo está más orientado a la purificación de la PrPsc y fue adaptado para la obtención de PrPc (Diringer *et al.*, 1997). No fue posible contar para este estudio con un protocolo de purificación específico para la PrPc que se adaptara a las condiciones de trabajo existentes. Las bandas de la PrPc que aparecen con un peso molecular de entre 33 a 35 kDa, coinciden con los estudios realizados por Bolton *et al.* (1982). Por otra parte, la digestión completa con proteinasa K de la PrPc es semejante a lo descrito por diversos autores (Bolton *et al.*, 1982; Prusiner, 1998; Lasmézas, 2003; Collins *et al.*, 2004) por lo cual en esta línea del gel no se observaron las bandas de esta proteína. A su vez, la digestión completa de la proteína priónica recombinante (PrPrec), por la acción de la proteinasa K, concuerda con lo descrito anteriormente por Korth *et al.* (1997). Además, el hecho de que en el gel no se observe la PrPrec se debe a que se carga en baja concentración para poder visualizarla en forma adecuada en su posterior electrotransferencia, ya que una mayor concentración dificultaría su interpretación en el Western Blot por su alta inmuno afinidad con el anticuerpo monoclonal.

La caracterización específica de estas proteínas se logró a través de la inmunoelectrotransferencia en la cual se visualiza la PrPc detectada por el anticuerpo primario 6H4 lo que coincide con los estudios realizados por otros investigadores (Korth *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2002). El hecho de que esta proteína muestre, tanto en el gel como en la placa, un peso molecular aproximado entre los rangos 15 y 34 kDa se confirma con lo descrito por Katz *et al.* (1992) y se asemeja a los estudios realizados por diversos autores (Prusiner 1998; Torres *et al.*, 2001; Castilla *et al.*, 2003). A su vez, la detección de la proteína priónica recombinante por el anticuerpo monoclonal coincide con lo descrito por Korth *et al.* (1997). Las bandas que se observan en un peso molecular aproximado de 31 kDa en las líneas de proteínas tratadas con proteinasa K corresponderían a esta enzima y se aprecian tanto en el gel como en la placa



radiográfica. La proteinasa K es detectada por el anticuerpo secundario y muestra un peso molecular aproximado de 31 kDa, lo cual fue descrito por Schaller *et al.*, (1999).

Las técnicas de electroforesis e inmunotransferencia fueron muy útiles en este estudio para detectar la presencia de la PrPc en el purificado obtenido y para demostrar la digestión completa de esta proteína al someterla a la acción de la proteinasa K. Sin embargo, fue la inmunotransferencia, mediante la detección específica por parte del anticuerpo monoclonal, la que permitió detectar más certeramente a la proteína priónica celular, además de hacer posible su comparación con una proteína priónica recombinante, que se utiliza rutinariamente como patrón patológico no infectivo en los métodos diagnósticos rápidos de BSE.

A pesar de que nuestro país es considerado libre de BSE y con bajo riesgo de introducción de esta enfermedad, es muy importante contar con métodos de diagnóstico específicos, rápidos, reconocidos y utilizados internacionalmente. Además el hecho de que esta prueba cuente con una alta sensibilidad y especificidad es esencial para el diagnóstico de una enfermedad de baja incidencia. El “kit” de inmunoensayo enzimático estudiado en esta memoria se utiliza en diversos países endémicos de BSE. La especificidad de una prueba de este tipo corresponde a la capacidad para identificar los animales sanos correctamente como negativos, mientras que la sensibilidad diagnóstica mide la capacidad de la prueba para detectar a los animales infectados como positivos (Anón, 2003).

Utilizando la prueba de ELISA de Bio-Rad (TeSeE) en el primer ensayo realizado en esta memoria 43 muestras resultaron negativas y fueron, por lo tanto, correctamente clasificadas. Considerando que las muestras estudiadas son negativas por histopatología y que nuestro país es libre de BSE se pudo calcular una especificidad para este estudio de un 95,6%. Es importante destacar que esta especificidad fue calculada exclusivamente para el ensayo realizado en esta memoria y que no representa la especificidad de la prueba diagnóstica.

La aparición en una primera instancia de 2 muestras sospechosas del total de 45 analizadas se debería a diversos factores. Bio-Rad describe como uno de los factores que puede llevar a la detección de falsos positivos a la contaminación cruzada de pocillos negativos con muestras que contienen grandes cantidades de PrPsc como por ejemplo, de los animales en

estado clínico de la enfermedad (Bio-Rad, 2003). Sin embargo, en este caso es poco probable que esto haya sucedido debido a que, como se corrobora en los resultados finales de este estudio, no se detectaron muestras positivas. En este caso, se podría haber producido una contaminación cruzada con los pocillos en que se depositaron los controles positivos, sin embargo, es difícil que esta sea la causa debido a la distancia en que se ubicaron los pocillos de las muestras sospechosas o positivas, respecto a los de los controles. Existe la posibilidad de que en este ensayo la aparición de los resultados en cuestión se deba a una mala trituración y homogeneización de las muestras. Esta mala trituración se pudo haber producido por el tamaño inadecuado de las muestras, de acuerdo a las recomendaciones de Bio-Rad, ya que las muestras estudiadas en este ensayo previamente fueron seccionadas para el estudio histopatológico y la detección inmunohistoquímica y por ende resultaron de un tamaño inferior a lo recomendado por el “kit” (Bio-Rad, 2003). Además, en este ensayo no fue posible contar con todos los equipos recomendados para trabajar con el “kit”, por lo cual se realizó una adaptación de lo existente, lo que puede influir directamente en la calidad de trituración de las muestras mencionadas. La trituración y homogeneización forman parte de la etapa de purificación de la PrPsc y son claves para la posterior detección inmunológica. Así, una trituración y homogeneización inadecuada puede influir en las etapas sucesivas como son la calibración y la digestión con proteinasa K. En la calibración se toma una alícuota de la muestra procesada para su posterior digestión con proteinasa K. La alícuota seleccionada de una muestra mal triturada puede contener sólidos que interfieren luego en la reacción de la muestra con las soluciones a utilizar, principalmente con la proteinasa K y con los anticuerpos utilizados. Por otra parte, una mala homogeneización, por su parte, puede producir que en la alícuota seleccionada no se encuentren las proteínas priónicas y que, por lo tanto, éstas no son detectadas por el anticuerpo monoclonal en la etapa de detección. Esto resultaría en la aparición de falsos negativos. Sin embargo, si la causa fuera una mala trituración y homogeneización, se obtendría un mayor porcentaje de muestras afectadas, lo que no sucedió en este caso. Además en este estudio puede haberse producido una digestión defectuosa de las muestras afectadas por errores de procedimiento como el pipeteo. Una mala digestión con proteinasa K puede dar origen a falsos positivos, debido a que el anticuerpo monoclonal reconoce tanto a la PrPsc como a la PrPc. Otro error frecuente en este tipo de ensayo de inmunodetección son los atribuibles a la persona que la realiza, lo cual aumenta cuando ésta no

cuenta con una capacitación. Es probable que este tipo de errores llevó, en este caso, a la aparición de dos muestras sospechosas.

Debido a las limitaciones de costo no fue posible repetir todas las muestras para realizar una comparación, sin embargo, es importante mencionar que las lecturas de densidad óptica de los duplicados de cada una de las muestras en la mayoría de los casos fueron muy similares. Esto demuestra que se trabajó en condiciones uniformes y que, por lo tanto, en general el método fue bien realizado. Además, posteriormente se repitió íntegramente la técnica para las muestras sospechosas, a pesar de que sólo uno de los duplicados de cada muestra contara con esta característica. Como resultado de este segundo ensayo cada muestra repetida nuevamente en duplicado resultó negativa, obteniéndose así finalmente un 100% de las muestras estudiadas como negativas.

En este estudio no fue posible determinar la sensibilidad de la inmunodetección del TeSeE debido a que no se contó con muestras positivas dentro del total analizado. Sin embargo, diversas investigaciones demuestran que de las 4 técnicas diagnósticas aprobadas internacionalmente por la Comisión Europea en 1999, el TeSeE es la más sensible y la que por lo tanto resulta ser la más adecuada para detectar la PrPsc en óbex de bovinos infectados en estados más tempranos de la enfermedad, al compararla con las otras pruebas como por ejemplo la del Western Blot (Moynagh *et al.*, 1999; Grassi *et al.*, 2001; Anón, 2003; Buschmann *et al.*, 2004). En nuestro país es importante implementar métodos de diagnóstico que detecten la BSE en forma rápida y temprana ya que hasta hoy se utiliza principalmente la histopatología que no es capaz de detectar la enfermedad en su etapa de incubación y que además necesita un tiempo mayor para su desarrollo. De las pruebas rápidas evaluadas por la Comisión Europea, tanto el Western Blot como las pruebas de ELISA detectan la enfermedad en las fases finales de incubación, sin embargo, el TeSeE demostró ser la prueba que la detecta más tempranamente (Moynagh *et al.*, 1999; Grassi *et al.*, 2001).

Posterior a la utilización de este método de detección de BSE se puede concluir que el “kit” de ELISA TeSeE es un método sencillo ya que puede ser realizado por sólo una persona especializada, además de ser rápido, pudiendo obtener los resultados de un total de 90 muestras en menos de 5 horas. La rapidez de una prueba de diagnóstico para BSE es muy

importante, debido a que en países endémicos los productos cárneos que se destinan a consumo deben ser probados como negativos a esta enfermedad en un corto tiempo ya que esta patología es considerada una zoonosis. Es entonces de vital importancia utilizar un método validado, rápido, sencillo y certero. Otras técnicas como la inmunotransferencia (Western Blot), a pesar de ser considerada una técnica rápida, demora mínimo 8 horas y es bastante más compleja de realizar. Por otra parte técnicas como la histopatología y la inmunohistoquímica quedan descartadas como pruebas rápidas debido a que los resultados por estos métodos se obtienen luego de al menos 48 horas. Además con la inmunohistoquímica y la histopatología se obtienen resultados cualitativos, lo que dificulta aún más la interpretación.

Los resultados obtenidos con el TeSeE son cuantitativos lo que favorece su interpretación. Esto diferencia positivamente a este método de otras técnicas rápidas como el Western Blot cuyos resultados son cualitativos y por ende, más subjetivos a la interpretación. Esto último puede llevar a un aumento de falsos negativos y/o falsos positivos. Esto fue ampliamente demostrado por Tabouret *et al.*, (2003) y por Buschmann *et al.*, (2004) que compararon la técnica de ELISA de Bio-Rad con el Western Blot desarrollado por Prionics. Los resultados de estos estudios arrojaron que en diferentes ocasiones muestras positivas para Scrapie o BSE no fueron detectadas por el Western Blot, resultando por lo tanto en falsos negativos. La técnica de ELISA detectó, por su parte, todas las muestras positivas adecuadamente. Es muy importante destacar este punto ya que la nueva variante de Creutzfeldt Jakob que afecta al hombre, se puede originar a partir del consumo de productos cárneos infectados con BSE, por lo cual es fundamental detectar correctamente esta enfermedad en estos productos, para prevenir y evitar que se siga presentando esta nueva variante.

Una de las características de procedimiento que diferencian al TeSeE de otras pruebas rápidas es que cuenta con un paso de purificación y concentración de PrPsc, previa a su detección, lo cual mejora su especificidad y sensibilidad. Las otras pruebas rápidas no cuentan con este paso de purificación, lo que las hace menos certeras. Por otra parte, una de las características importantes de este método es que utiliza dos anticuerpos monoclonales, a diferencia de otras técnicas rápidas. Esto hace que aumente su especificidad y sensibilidad. El Western Blot utiliza un anticuerpo secundario policlonal, lo que la hace menos efectiva. Por su

parte, la prueba de ELISA desarrollada por Enfer Scientific Irlanda utiliza dos anticuerpos policlonales.

La prueba de ELISA desarrollada por CEA y comercializada por Bio-Rad es en la actualidad una de las más eficientes, sensibles y específicas. El Western Blot por su parte, cuenta con diversas características que deberían ser mejoradas. Se perfeccionaría, por ejemplo, al utilizar sólo anticuerpos monoclonales. La inmunohistoquímica es una técnica bastante certera, pero debido al tiempo necesario para su realización es considerada como una prueba confirmatoria. La histopatología es muy inferior a las técnicas mencionadas, por lo que debería ser reemplazada por otras más eficientes.

Dentro de los aspectos negativos de este “kit” de ELISA se pueden mencionar que no se adapta fácilmente a muestras de tejido de menor tamaño. Normalmente durante el desarrollo de esta técnica se utilizan jeringas especiales que toman una submuestra de determinado peso y homogeneidad lo que en este caso no fue posible, debido al tamaño de las muestras. Esto, como se mencionó anteriormente, pudo haber influido en la adecuada trituración y homogeneización de algunas muestras. Por otra parte, se hace necesario contar con los equipos recomendados por Bio-Rad para perfeccionar el procedimiento de este método con los cuales no se cuenta en el país. Este hecho implica que para una buena implementación de este método de diagnóstico rápido para BSE, es imprescindible una alta inversión inicial que va a depender de las necesidades y objetivos de un país y de los recursos económicos de éste.

De esta forma, el análisis y la discusión de los resultados obtenidos en el presente estudio, permite destacar las principales conclusiones que se describen a continuación.

## **IX. CONCLUSIONES.**

1. Mediante el protocolo de purificación utilizado fue posible obtener la proteína priónica celular (PrPc), a partir de cerebros de bovino.
2. A través de electroforesis e inmunotransferencia se logró caracterizar la proteína priónica celular (PrPc) y compararla con una proteína priónica recombinante.
3. Utilizando el “kit” de inmunoensayo enzimático (ELISA) fue posible analizar las características inmunoreactivas de las muestras de óbex de bovino.
4. A través de este estudio se logró implementar el inmunoensayo enzimático (ELISA) como método de diagnóstico para la detección de proteína priónica patológica (PrPsc), agente etiológico de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE).

## X. BIBLIOGRAFÍA

- **AGUZZI, A.; MONTRIASO, F; KAESER, P.S.** 2001. Prions: Health scare and biological challenge. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2: 118-126.
  
- **ALMOND, J.; PATTISON, J.** 1997. Human BSE. *Nature* 389: 437-438.
  
- **ANDREWS, N.; FARRINGTON, C.; WARD, H.; COUSENS, S.; SMITH, P.; MOLESWORTH, A.; KNIGHT, R.; IRONSIDE, J.; WILL, R.** 2003. Death from variant Creutzfeld-Jakob Disease in the United Kingdom. *Lancet* 361:751-752.
  
- **ANÓNIMO.** 2003. Japón: un caso atípico de encefalopatía espongiforme bovina. *Prod. Anim.*193: 84-85.
  
- **BIO-RAD.** 2003. Detection des encephalopathies spongiform transmissibles. Test TeSeE. Classeur de formation. Centre de Formation Biologique. Paris, France. 188 pp.
  
- **BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER, S.B.** 1982. Identification of a protein that purified with the Scrapie prion. *Science.* 218: 1309-1310.
  
- **BROWN, D.R.; QIN, K.; HERMS, J.W.; MADLUNG, A.; MANSON, J.; STROME, R.; FRASER, P.E.; KRUCK, T.; VON BOHLEN, A.; SCHULZ-SCHAEFFER, W.; GIESE, A.; WESTAWAY, D.; KRETZSCHMAR, H.** 1997. The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* 390: 684-687.
  
- **BRUCE, M.E.; WILL, R.G; IRONSIDE, J.W.; MCCONNELL, I.; DRUMMOND, D.; SUTTLE, A.; MCCARDLE, L.; CHREE, A.; HOPE, J.; BIRKETT, C.; COUSENS, S.; FRASER, H.; BOSTOCK, C.J.** 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501.

- **BRUN, A.; CASTILLA, J.; PARRA, B.; RODRÍGUEZ, F.; TORRES, J.M.** 2003. Implicación del sistema inmunológico en la patogénesis de las encefalopatías espongiformes transmisibles. *Rev. Neurol.* 37 (7): 648-653.
  
- **BURNETTE, W.N.** 1981 Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocelulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated proteins. **In:** *Antibodies. A laboratory manual.* Eds. Harlow David Lane. United Kingdom. 726 pp.
  
- **BUSCHMANN, A.; BIACABE, A.G.; ZIEGLER, U.; BENESIK, A.; MADEC, J.Y.; ERHARDT, G.; LUHKEN G.; BARON, T.; GROSCUP, M.H.** 2004. Atypical Scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Meth.* 117: 27-36.
  
- **CASTILLA, J.; BRUN, A.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PINTADO, B.; TORRES, J.M.** 2002. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en especies ganaderas y silvestres. *Invest. Agrar. Prod. Sanid. Anim.* Vol.17 (1-2) 15 pp.
  
- **CAUGHEY, B.; KOCISKO, D.A.** 2003. Prion diseases: A nucleic-acid accomplice? *Nature* 425: 673-674.
  
- **COLLINGE, J.** 1999. Variant Creutzfeld- Jakob disease. *Lancet* 354: 317-323.
  
- **COLLINS, S.J.; LAWSON, V.A.; MASTERS, C.L.** 2004. Transmissible spongiform encephalopathies. *Lancet* 363: 51-61.
  
- **DIRINGER, H.; BEEKES, M.; ÖZEL, M.; SIMMON, D.; QUECK, I.; CARDONE, F.; POCCHIARI, M.; IRONSIDE, J.** 1997. Highly infectious purified preparations of diseases-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleics acids of viral size. *Intervirology* 40: 238-246.



- **DOMÍNGUEZ, A.; MATA, E.; SALLERAS, L.** 1998. Los priones y las enfermedades neurodegenerativas transmisibles. *Med. Clin.* 110: 751-757.
- **DORMONT, D.** 2002. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett.* 529:17-21.
- **FISCHER, M.B.; ROECKI, C.; PARIZEK, P.; SCHWARZ, H.P.; AGUZZI, A.** 2000. Binding of disease-associated prion protein to plasminogen. *Nature* 408: 479-483.
- **GASSET, M.; WESTAWAY, D.** 2000. Los priones y su biología. <<http://www.sneurología.org/congreso/priones.html>. > [consulta: 01-05-2003]. 6 pp.
- **GLATZEL, M.; AGUZZI, A.** 2001. The shifting biology of prions. *Brain Res. Rev.* 36: 241-248.
- **GRASSI, J.; COMOY, E.; SIMON, S.; CRÉMINON, C.; FROBERT, Y.; TRAPMANN, S.; SCHIMMEL, H.; HAWKINS, S.A.C.; MOYNAGH, J.P.; DESLYS, J.; WELLS, G.A.H.** 2001. Rapid test for the preclinical postmortem diagnosis of BSE in central nervous system tissue. *Vet. Rec.* 149: 577-582.
- **HUANG, F. P.; MACPHERSON G.G.** 2004. Dendritic cells and oral transmission of prion diseases. *Adv. Drug. Delivery. Rev.* 56: 901-913.
- **HUR, K.; KIM, J.I.; CHOI, S.I.; CHOI, E.K.; CARP, R.I.; KIM, Y.S.** 2002. The pathogenic mechanism of prion diseases. *Mech. Ageing. Dev.* 123: 1637-1647.
- **KATZ, J.B.; PEDERSEN, J.C.; JENNY, A.L.; TAYLOR, W.D.** 1992. Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 447-449.

- **KONOLD, T.** 2003. Clinical signs of bovine spongiform encephalopathy in cattle. **In:** VIIth. International Workshop on the diagnosis of spongiform encephalopathies. New Haw, Addlestone, Surrey. United Kingdom. 24-28 november. Veterinary Laboratories Agency Weybridge 13 pp.
  
- **KORTH, C.; STIERLI, B.; STREIT, P.; MOSER, M.; SCHALLER, O.; FISHER, R.; SHULZ-SCHAEFFER, W.; KRETZSCHMAR, H.; RAEBER, A.; BRAUN, U.; EHRENSPERGER, F.; HORNEMANN, S.; GLOCKSHUBER, R.; RIEK, R.; BILLETER, M.; WUTHRICH, K.; OESCH, B.** 1997. Prion (PrP<sup>Sc</sup>)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 390: 74-77.
  
- **LAEMMLI, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
  
- **LASMÉZAS, C. I.** 2003. The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Sci. O.I.E. (Off. int. Epiz.)* 22 (1): 23-36.
  
- **LIU W.G.; BROWN, D.A.; FRASER, J.R.** 2002. Immunohistochemical detection of PrP in the CNS of mice infected with Scrapie using three Anti-PrP Antibodies. **In:** International Conference on Transmissible Spongiform Encephalopathies. Edinburgh 15-18 Sept. P1.6.
  
- **LLEWELYN, C.A.; HEWITT, P.E.; KNIGHT, R.S.G.; AMAR, K.; COUSENS, S.; MACKENZIE, J.; WILL, R.G.** 2004. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jacob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421.
  
- **MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S.** 2002. Neurotoxicity and Neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298:1781-1785.
  
- **MOMCILOVIC, D.; RASOOLY, A.** 2000. Detection and analysis of animal materials in food and feed. *J. Food. Prot.* 63 (11) 1602-1609.

- **MOYNAGH, J.; SCHIMMEL, H.; KRAMER, G.N.** 1999. The evaluation of test for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathy in bovines. **In:** Detection des encephalopathies spongiform transmissibles. Test TeSeE. Classeur de formation. Centre de Formation Biologique. Paris, France. 188 pp.
  
- **OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (O.I.E).** 2000. Bovine spongiform encephalopathy. **In:** Manual of standards for diagnostic test and vaccines; 4<sup>a</sup> edition. OIE. Paris. Francia. 957 pp.
  
- **OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS (O.I.E.).** 2004. Bovine spongiform encephalopathy in France. Atypical cases. <<http://www.oie.com>> [consulta: 29-05-2004].
  
- **PRINCE, M.J; BAILEY, J.A.; BARROWMAN, P.R.; BISHOP, K.J.; CAMPBELL, G.R.; WOOD, J.M.** 2003. Bovine spongiform encephalopathy. Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epiz.) 22:37-60.
  
- **PRUSINER, S.B.** 1991. Molecular biology of prion diseases. Science 252: 1515-1522.
  
- **PRUSINER, S.B.** 1995. The prion diseases. Sci. Am. 272: 48-57.
  
- **PRUSINER S.B.** 1998. Prions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 13363-13383.
  
- **REY-GAYO, A.; CALBO-TORRECILLA, F.** 2002. Estructura de proteínas: plegamiento y priones. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 20: 161-167.
  
- **RYDER, S.J.; WELLS, G.A.H.; BRADSHAW, J.M.; PEARSON, G.R.** 2001. Inconsistent detection of PrP in extraneuronal tissues of cats with feline spongiform encephalopathy. Vet. Rec. 148: 437-441.
  
- **SABORIO, G.; PERMANNE, B.; SOTO, C.** 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. Nature 411: 810-813.

- **SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (S.A.G).** 2003. Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) Situación actual. <<http://www.sag.gob.cl/framearea.asp?cod=12> > [consulta: 05-08-2003]
  
- **SCHALLER, O.; FATZER, R.; STACK, M.; CLARK, J.; COOLEY, W.; BIFFIGER, K.; EGLI, S.; DOHERR, M.; VANDEVELDE, M.; HEIM, D.; OESCH, B.; MOSER, M.** 1999. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrPsc detection and its use as a rapid method for the diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). *Acta. Neuropathol.* 98: 437-443.
  
- **TABOURET, G.; ANDREOLETTI, O.; FOUCRAS, G.; LACROUX, C.; SCHELCHER, F.** 2003. Comparaison des tests BioRad TeSeE et TeSeE Petit Ruminants et Prionics Check Western pour la détection de la PrPres, à partir d'échantillons de tissus lymphoïdes et de moelle épinière d'ovins à différents stades d'incubation de tremblante. **In:** *Detection des encephalopathies spongiformes transmissibles. Test TeSeE. Classeur de formation. Centre de Formation Biologique. Paris, France. 188 pp.*
  
- **TORRES, J.M.; BRUN, A.; CASTILLA, J.; SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M.** 2001. Enfermedades producidas por priones. <<http://www.sanidadanimal.info/priones/priones.htm> .> [ consulta 11- 04-2003] 10 pp.
  
- **WEISSMANN. C.; ENARI, M.; KLÖHN, P.C.; ROSSI, D.; FLECHSIG, E.** 2002. Molecular biology of prions. *Acta. Neurobiol.* 62:153-166.
  
- **WELLS, G. A.** 2003. Differential diagnosis of vacuolar changes in the CNS of ruminant species. **In:** VIIth. International Workshop on the diagnosis of spongiform encephalopathies. New Haw, Addlestone, Surrey. United Kingdom. 24-28 november 2003. Veterinary Laboratories Agency Weybridge 6 pp.

- **WILL, R.G.** 2002. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurobiol. Exp.* 62: 167-173.
  
- **WILLERROIDER, M.** 2003. Routine test reveal unknown strains of BSE prions. *Nature* 425: 648.
  
- **WILLIAMS, E.S.; MILLER, M.M.** 2003. Transmissible spongiform encephalopathies in non-domestic animals origin transmission and risk footors. *Rev. Sci.Tech. O.I.E. (Off. Int. Epiz.)* 22: 145-156.