

## **Detección de proteínas prionicas en cerebros de bovino mediante inmunoensayo enzimático.** (Detection of prion proteins from bovine's brains through a ELISA).

**Farías R., Gustavo** : Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11735. Casilla 2. correo 15. La Granja Santiago, Chile. [gfarías@uchile.cl](mailto:gfarías@uchile.cl) | **Machuca N., Alvaro** : Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11735. Casilla 2. correo 15. La Granja Santiago, Chile | **Padilla D., Daniella** : Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11735. Casilla 2. correo 15. La Granja Santiago, Chile | **Lecocq P., Claudio**: Servicio Agrícola y Ganadero. Unidad de Patología Animal del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias Pecuarias.

REDVET: 2007, Vol. VIII Nº 3.

Recibido: 08.01.07 / Referencia: 070312 / Aceptado: 15.02.07 / Publicado: 01.03.07

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030307.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n030307/030713.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®. Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con Veterinaria.org® <http://www.veterinaria.org> y con RECVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet> - <http://www.redvet.es>

### **Resumen**

La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) pertenece a un grupo de enfermedades neurodegenerativas denominadas Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), dentro de las cuales se destacan además la Enfermedad de Creutzfeld-Jakob (ECJ) con su nueva variante (vECJ) en los humanos y el Scrapie en animales. Estas patologías se caracterizan por ser mortales, tener un largo período de incubación, signos neurológicos progresivos y por presentar lesiones vacuolares en la materia gris del sistema nervioso central (SNC).

El agente etiológico de estas patologías se denomina "prión" (partícula infecciosa de naturaleza proteica, PrP) y consiste en una isoforma infectiva (PrP<sup>Sc</sup>), de una proteína

constitutiva celular normal (PrP<sup>C</sup>) que posee una gran resistencia a la proteinasa K.

Pese a que en Chile no se han diagnosticado casos de EEB, es importante contar con herramientas diagnósticas de alta especificidad, rápidas y reconocidas internacionalmente, por lo cual se realizó una inmunodetección de PrP mediante un "kit" de inmunoensayo enzimático (ELISA). Se analizaron 90 muestras de óbex bovinos mayores de 30 meses de edad, provenientes de mataderos de la Región Metropolitana. Inicialmente se obtuvieron 2 muestras sospechosas, las que luego de un nuevo ensayo se sumaron al resto de las que inicialmente fueron diagnosticadas como negativas, obteniendo finalmente un 100% de las muestras estudiadas negativas a EEB.

A partir de este estudio se establecieron las pautas para la implementación de este método diagnóstico de la EEB en nuestro país, lo cual nos permite contar con una de las herramientas diagnósticas más rápida,

reconocida y utilizada a nivel internacional para la prevención, el control y el reconocimiento de la EEB.

Palabras clave: EEB | prion | EETs | ELISA |

---

## Abstract

The bovine spongiform encephalopathy (BSE) belongs to a group of neurodegenerative disease called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) that it includes the Creutzfeld-Jakob's Disease (CJD) with his new variant (vCJD) in human and the Scrapie in animals. These pathologies are characterized for being mortal, having a long period of incubation, neurological progressive signs and for presenting vacuoles in the gray matter of the nervous central system (SNC).

The etiologic agent of these pathologies called "prion" (infectious particle protein, PrP) and consists of an infective isoform (PrP<sup>Sc</sup>) of a cellular normal constitutive protein (PrP<sup>C</sup>) that have a great resistance to the proteinase K.

In spite of that in Chile have not been diagnosed cases of BSE, it is important to

rely on diagnostic tools of high specificity, rapid and recognized internationally, for which was realized an immunodetection of PrP by means of a "kit" of ELISA. 90 samples of obex's bovine major of 30 months of old from slaughterhouses of Metropolitan Region were analyzed. Initially 2 suspicious samples obtained, which after a new assay they added to the rest of those who were negative previously, obtaining finally 100% of the samples in study negatives to BSE.

From this study the guidelines were established for the implementation of this diagnostic method for the BSE in our country, which allows us to rely on of the diagnostic tools more fast, recognized and used worldwide for prevention, control and the recognition of BSE.

Keywords: BSE | prion | TSEs | ELISA |

---

## Introducción.

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) también llamadas enfermedades priónicas, corresponden a las enfermedades más intrigantes que afectan el sistema nervioso de los humanos y animales (Castilla *et al.*, 2005). En éstos últimos años adquiere mayor importancia la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), diagnosticada por primera vez en 1986 en el Reino Unido por Wells y Wilesmith (Prusiner, 1995).

La causa por la se originó la EEB permanece aún en discusión, el mundo científico ha propuesto diversas teorías que hablarían de este origen (FAO, 2003; Prince *et al.*, 2003; Colchester y Colchester, 2005). Sin embargo, la más aceptada hasta hoy plantea que la génesis de la EEB estaría en las harinas de carne y hueso (HCH) destinadas al consumo en bovinos, las cuales estarían contaminadas con el agente causal de otra EET, el Scrapie. Esto se debería a un cambio en el procesamiento en la fabricación de las HCH, con lo cual el agente etiológico se mantuvo infectivo, traspasando la barrera interespecie y desencadenando la enfermedad en los bovinos (Cantarino y Junqueira, 2000).

Actualmente se acepta ampliamente que el agente etiológico de la EEB, y del resto de las EETs, es el prión (Hur *et al.*, 2002), que corresponde a la forma alterada de una proteína celular

constitutiva de membrana celular funcional (PrP<sup>C</sup>) de los mamíferos, la cual pierde su función normal adquiriendo la capacidad de transformar la forma normal en patológica (PrP<sup>Sc</sup>) (Prusiner, 1995). La primera posee un peso molecular de 33-35 kDa, es soluble, sensible a compuestos químicos diversos y susceptible a la digestión con proteínasa K, mientras que la PrP<sup>Sc</sup>, posee el mismo peso, pero es insoluble, resistente a la proteínasa K, al calor y a muchos compuestos químicos, lo cual se debe a su estructura espacial. Al contactarse con la proteínasa K, la PrP<sup>C</sup> se destruye completamente, en cambio la PrP<sup>Sc</sup> sufre una digestión parcial, originando una fracción resistente de 27-30 kDa, que se mantiene infectiva.

La EEB es una enfermedad neurológica evolutiva, subaguda o crónica que implica grandes cambios en el estado mental del animal (FAO, 2003). El período de incubación varía entre los 2 y 8 años, con un promedio de 4 a 5 años. Es por esto que la enfermedad sólo se manifiesta en los bovinos adultos, de ambos sexos. El cuadro clínico se manifiesta entre las 2 semanas a 6 meses (SAG, 2005), y se caracteriza por 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) (Konold, 2003).

La importancia de la EEB, además de las consecuencias económicas para la industria derivada de la explotación del ganado vacuno, aumentó considerablemente con la aparición de una nueva variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, en 1996, la cual estaría estrechamente relacionada con la EEB y que afecta al humano a través del consumo de alimentos cárnicos de origen bovino (Will, 2002). Por estas razones, se tomaron medidas extremas en el Reino Unido, donde se sacrificaron miles de cabezas de ganado bovino, con consecuencias económicas nefastas (CDC, 1996; Pattison, 1998; Castilla *et al.*, 2002).

En este sentido, el objetivo central de este estudio fue evaluar un método diagnóstico rápido, sensible y específico para la EEB, el que fue aprobado por la Comisión Europea y reconocido a nivel internacional, para implementarlo en nuestro país.

## **Materiales y Métodos.**

Para realizar la inmunodetección se utilizaron 90 muestras de óbex de bovinos mayores de 30 meses de edad, sin importar raza ni sexo, provenientes de mataderos de la Región Metropolitana. Una vez obtenidas las muestras se transportaron refrigeradas para posteriormente mantenerlas congeladas a -20°C.

Se utilizó un "kit" comercial basado en una prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) (TeSeE, Bio-Rad). Este "kit" consta de 2 partes, la primera de purificación de muestras para la obtención de PrP<sup>Sc</sup> y la segunda de detección inmunoenzimática en microplaca (ELISA). Todas las muestras fueron procesadas en duplicado.

1. Purificación. De cada muestra se tomaron 350 mg de óbex y se depositaron en tubos para la trituración en 2 ciclos de 45 seg de agitación, separados por una centrifugación a 10.000 x g por 1 min. Posteriormente, se logró la calibración tomando 250 µl de la solución de cada triturado, que se traspasaron a tubos eppendorf. Este paso se realizó en duplicado. A cada tubo se le agregó 250 µl de una solución de proteínasa K incubándose a 37°C por 10 min. A continuación, a cada tubo se le agregó 250 µl de una solución precipitadora con azul de bromofenol, obteniéndose un color azul homogéneo en todos los tubos, los que posteriormente se centrifugaron a 12.000 x g a 20°C por 9 min. Finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante y se les agregó a cada tubo 25 µl de una solución de solubilización, incubándose en baño maría a 100°C por 5 min. De esta manera se obtuvieron soluciones uniformes para cada muestra en estudio, con las cuales se desarrolló la detección de PrP<sup>Sc</sup> por inmunoensayo (ELISA).

2. Detección. Para el inmunoensayo (ELISA de captura) se utilizaron microplacas de poliestireno de 96 pocillos, recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-PrP. Además, se prepararon los controles positivos, añadiendo a un tampón de PBS pH 7,4 un péptido sintético no infeccioso, y para el control negativo se utilizó tampón PBS pH 7,4 suplementado con albúmina sérica bovina (BSA). Todas las muestras se diluyeron con una solución tampón PBS pH 7,2 suplementado con BSA y rojo fenol.

Las muestras y los controles (100 $\mu$ l) fueron distribuidos en la microplaca la que fue incubada a 37°C por 75 min. Luego de este tiempo se realizaron 3 ciclos de lavado con una solución Tris-NaCl pH 7,4. Posteriormente, se agregaron 100  $\mu$ l de la solución de conjugado, que contiene el segundo anticuerpo monoclonal anti PrP conjugado con peroxidasa, y se incubó a 4°C por 60 min, seguida de 5 ciclos de lavados. Se adicionaron 100  $\mu$ l por pocillo de una solución de revelado (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%) más el cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB). Se incubó la microplaca bajo un ambiente oscuro por 30 min. Luego se detuvo la reacción agregando 100  $\mu$ l por pocillo de solución de parada (ácido sulfúrico 1N). Transcurridos 7 min se determinó 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. Las condiciones que validan este ensayo se encuentran establecidas por Bio-Rad (2003).

Las muestras fueron analizadas de acuerdo a valor umbral (V.U.) calculado (Bio-Rad, 2003). Así las positivas serán igual o mayor al V.U., las negativas se encontrarán bajo este valor, y las sospechosas corresponderán a las muestras que se encuentren justo bajo dicho valor, también llamado valor límite (V.U. - 10%).

## **Resultados.**

Luego de obtener la lectura de la D.O. de la inmunoreacción de las muestras en cada pocillo de la microplaca, se calculó el promedio de los valores obtenidos de cada una de ellas y posteriormente el promedio total para realizar el análisis de los resultados, que a continuación se validaron interpretaron y de acuerdo a lo establecido por Bio-Rad (2003)

Para el análisis de las muestras se calculó el valor umbral, que es igual a la lectura de la D.O. de los controles negativos más una constante 0,210, resultando el valor de 0,24625 D.O. Posteriormente se obtuvo el valor límite (V.U. - 10%) que fue de 0,2217 D.O.

De acuerdo a esto, se clasificaron las muestras como positivas, sospechosas o negativas. A partir de los promedios de la lectura obtenidos de cada muestra y su correspondiente contramuestra, el análisis de la totalidad de las muestras en estudio (n=90) fue el siguiente: 88 de ellas (95,6%) fueron consideradas negativas por tener un valor de lectura más inferior al valor límite y solamente 2 (4,4 %) resultaron sospechosas, ya que en un caso se superó el valor límite y en el otro, se obtuvo un resultado muy cercano a dicho valor. Ambas muestras sospechosas fueron sometidas nuevamente a un ensayo de inmunoreacción enzimática (Padilla, 2004).

Luego de realizar el segundo ensayo para las 2 muestras sospechosas, se calculó el nuevo valor umbral, al cual se le restó el 10%, obteniendo el valor límite, que fue de 0,2203 unidades de D.O. Ambas muestras se situaron más por debajo de dicho valor, por lo tanto se consideraron negativas. De esta forma, finalmente las 90 muestras analizadas resultaron ser negativas a la prueba de ELISA. Estos resultados se resumen en la tabla I.

**Tabla I: Tabla resumen final del total de muestras estudiadas**

<b>Muestras</b>	<b>Nº</b>	<b>Porcentajes (%)</b>
Positivas	0	0
Sospechosas	0	0
Negativas	90	100
Total	90	100

### **Discusión y Conclusión.**

Aún cuando en el país no se han descrito casos de EEB y se presume un bajo riesgo de introducción de la enfermedad, es importante contar con los métodos diagnósticos específicos, rápidos, reconocidos y utilizados internacionalmente. Además el hecho de que esta prueba, el inmunoensayo enzimático, cuente con una alta sensibilidad y especificidad, es esencial para el diagnóstico de una enfermedad de baja incidencia.

De esta forma, utilizando la prueba de ELISA (TeSeE, Bio-Rad) en el primer ensayo realizado en este estudio 88 muestras resultaron negativas y fueron, por lo tanto, correctamente diagnosticadas. Considerando que las muestras estudiadas posteriormente fueron negativas al diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico, y que en nuestro país no se han presentado casos de EEB se pudo calcular una especificidad para este estudio de un 95,6%. Es importante destacar que ésta fue calculada exclusivamente para el ensayo realizado en las condiciones actuales del laboratorio utilizado en este estudio y que no representa necesariamente la especificidad de la prueba diagnóstica.

La aparición, en primera instancia, de 2 casos sospechosos del total de las 90 muestras analizadas se debería a diversos factores, pero lo cierto es que el más importante se debió quizás a la mala trituración y homogeneización de las muestras. La mala trituración se debió a que el tamaño de las muestras fue inadecuado de acuerdo a las recomendaciones de Bio-Rad (2003), pues las mismas fueron utilizadas además para histopatología e inmunohistoquímica; y por otra parte en este ensayo no fue posible usar los equipos recomendados para trabajar con este "kit". La trituración y homogeneización forman parte de la etapa de purificación de la PrP<sup>Sc</sup> 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, lo que resultaría en la aparición de falsos negativos (Padilla, 2004).

Sin embargo, al realizar el segundo ensayo a las muestras sospechosas, éstas resultaron negativas, por lo cual, el 100% de las muestras estudiadas fueron negativas a EEB de acuerdo a las recomendaciones estipuladas por el "kit" (Bio-Rad, 2003).

Posterior a la utilización de este método de detección de EEB se pudo concluir que el "kit" de ELISA TeSeE es un método sencillo ya que puede ser realizado por una persona entrenada, además de ser rápido, permitiendo obtener los resultados de un total de 90 muestras en menos de 5 horas, en comparación a la inmunotransferencia (Western Blot), la que 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.

En relación a otras pruebas diagnósticas para la EEB, los resultados obtenidos con este "kit" son cuantitativos, lo que favorece su interpretación a diferencia con el Western blot, cuyos resultados son cualitativos y por ende, más subjetivos a la interpretación, pudiendo diagnosticarse muestras como 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 un tipo de Western Blot.

Por otra parte, el "kit" TeSeE es capaz de detectar casos positivos de Scrapie con porcentajes de sensibilidad y especificidad muy altos (EFSA, 2005), características que son esenciales para una prueba diagnóstica en un país como Chile donde la incidencia del Scrapie es aparentemente nula. En Chile no existen grandes recursos como para tener pruebas diagnósticas específicas para Scrapie y EEB por separado, por lo tanto es importante destacar la ventaja comparativa que tiene el "kit" ELISA TeSeE, ya que es un método validado, rápido, sencillo y certero que puede ser usado para realizar el diagnóstico conjunto de ambas enfermedades con altos niveles de sensibilidad y especificidad.

### **Bibliografía.**

1. BIO-RAD. Detection des encephalopathies spongiform transmissibles. Test TeSeE. Classeur de formation. Centre de Formation Biologique. Paris, France, 2003, 188 pp.
2. BUSCHMANN, A.; BIACABE, A.G.; ZIEGLER, U.; BENESIK, A.; MADEC, J.Y.; ERHARDT, G.; LUHKEN G.; BARON, T.; GROSCHUP, M.H. Atypical Scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J. Virol. Meth.*, 2004, 117: 27-36.
3. CANTARINO, L.; JUNQUEIRA, J. Encefalopatía Espongiforme Bovina. *Rev. CFMV. Brasilia DF.*, 2000, 21: 8-14.
4. CASTILLA, J.; BRUN, A.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PINTADO, B.; TORRES, J.M. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en especies ganaderas y silvestres. *Invest. Agrar. Prod. Sanid. Anim.*, 2002, Vol.17 (1-2) 15 pp.
5. CASTILLA, J.; SAA, P.; HETZ, C.; SOTO C. In vitro generation of infectious Scrapie prions. *Cell*, 2005, 121: 195-206.
6. (CDC) CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTIONS. News and Notes: BSE meeting at Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). *Emerg. Infec. Dis.*, 1996, 2: 157.
7. COLCHESTER, A.; COLCHESTER, N. The origin of spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet*, 2005, 366: 856-861.
8. (EFSA) EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Evaluation of Rapid post mortem TSE Tests intended for Small Ruminants. *EFSA Scientific Report.*, 2005, 31, 1-17.
9. (FAO) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Manual técnico para el reconocimiento de la EEB, 2003, 81 pp.
10. HUR, K.; KIM, J.I.; CHOI, S.I.; CHOI, E.K.; CARP, R.I.; KIM, Y.S. The pathogenic mechanism of prion diseases. *Mech. Ageing. Dev.*, 2002, 123: 1637-1647.
11. KONOLD, T. Clinical signs of bovine spongiform encephalopathy in cattle. In: VIIth. International Workshop on the diagnosis of spongiform encephalopathies. New Haw, Addlestone, Surrey. United Kingdom., 2003, 24-28 november. Veterinary Laboratories Agency Weybridge 13 pp.
12. PADILLA, D. Detección de proteína priónica mediante inmunoensayo enzimático. Memoria Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile, 2004, 68 pp.
13. PATTISON, J. The emergence of bovine spongiform encephalopathy and related diseases. *Emerg. Infec. Dis.*, 1998, 4: 390-394.
14. PRINCE, M.J.; BAILEY, J.A.; BARROWMAN, P.R.; BISHOP, K.J.; CAMPBELL, G.R.; WOOD, J.M. Bovine spongiform encephalopathy. *Rev. Sci. Tech. O.I.E. (Off. Int. Epiz.)*, 2003, 22:37-60.
15. PRUSINER, S. The Prion Diseases. *Scientific American*, 1995, 272(1): 48-57.
16. (SAG) SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. Instructivo técnico para la vigilancia de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs), Chile, 2005, 54 pp.
17. TABOURET, G.; ANDREOLETTI, O.; FOUCRAS, G.; LACROUX, C.; SCHELCHER, F. 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 différent stades d'incubation de tremblante. In: Detection des encephalopathies spongiform transmissibles. Test TeSeE. Classeur de formation. Centre de Formation Biologique. Paris, France, 2003, 188 pp.
18. WILL, R.G. Variant Creutzfeld–Jacob disease. Acta Neurobiol. Exp., 2002, 62: 167-173.



**REDVET®** Revista Electrónica de Veterinaria (ISSN nº 1695-7504) es medio oficial de comunicación científico, técnico y profesional de la Comunidad Virtual Veterinaria, se edita en Internet ininterrumpidamente desde 1996. Es una revista científica veterinaria referenciada, arbitrada, online, mensual y con acceso a los artículos íntegros. Publica trabajos científicos, de investigación, de revisión, tesis doctorales, casos clínicos, artículos divulgativos, de opinión, técnicos u otros de cualquier especialidad en el campo de las **Ciencias Veterinarias** o relacionadas a nivel internacional.

Se puede acceder vía web a través del portal Veterinaria.org®. <http://www.veterinaria.org> o en desde **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>

Se dispone de la posibilidad de recibir el Sumario de cada número por correo electrónico solicitándolo a [redvet@veterinaria.org](mailto:redvet@veterinaria.org)

Si deseas postular tu artículo para ser publicado en **REDVET®** contacta con [redvet@veterinaria.org](mailto:redvet@veterinaria.org) después de leer las Normas de Publicación en <http://www.veterinaria.org/normas.html>

Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org®. <http://www.veterinaria.org> y **REDVET®** <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://www.redvet.es>