



GANADERÍA

Diagnóstico de la Encefalopatía espongiforme bovina. Actuación en el Laboratorio de Sanidad Animal (U.A.S.A.)

Carmen Arnau

Concha Caballero

LABORATORIO DE SANIDAD ANIMAL
CONSELLERIA DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN



El pasado mes de diciembre, llegaron al Laboratorio de Sanidad Animal de la Comunidad Valenciana los primeros test “prionic” para el análisis de muestras y detección de la encefalopatía espongiforme bovina, causante del mal de las “vacas locas”. En la presentación de los mismos a los medios de comunicación, la consellera Ramón-Llin aseguró que el principal objetivo del Gobierno Valenciano es garantizar la salud de los ciudadanos, impidiendo que ningún animal enfermo pueda llegar a la cadena alimentaria.

Con la llegada de esta primera remesa de tests se cumplen las previsiones realizadas desde la Conselleria de Agricultura para el seguimiento de la normativa europea, que obliga a la realización de estas pruebas desde el pasado mes de enero.

“Lo más importante de este sistema analítico adoptado por todos los estados miembros de la UE –dijo la consellera- es que permite una gran rapidez en la obtención de los resultados, además de un altísimo nivel de garantía”.

En este artículo se describe todo el proceso que se ha seguido desde el momento que se detectó el problema hasta la decisión de adoptar el test “prionic”, así como la sistemática del proceso analítico.

ANTECEDENTES

En 1987, año en el que la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) fue declarada en el Reino Unido, tres técnicas diagnósticas, además del diagnóstico clínico, fueron utilizadas en el Laboratorio Central de Veterinaria de Weybridge (LCV):

➤ **Exámen histopatológico**, prueba estándar de referencia para la OIE ; basado en la detección de la característica vacuolización que afecta a la sustancia gris del cerebro, distribuida de forma simétrica y bilateral en la zona del óbex. En la EEB son más frecuentes las lesiones vacuolares en el neuropilo de la sustancia gris, a diferencia del **scrapie**. Estas vacuolas son más pequeñas y más regulares dando al cerebro un aspecto de “esponja” que da nombre a la enfermedad.

➤ **Detección de fibrillas SAF** en homogeneizados de tejido cerebral por microscopía electrónica y tinción negativa. La técnica se basa en el hecho constatado de que en los extractos purificados de encéfalos de animales infectados experimentalmente y en los que padecían la enfer-

medad de forma natural aparecían unas fibrillas que no aparecían en los animales sanos.

Cuando se descubrió que las fibrillas SAF estaban formadas por una **proteína prión PrP** alterada, resistente a las proteasas, se abrió una puerta a la investigación de nuevas técnicas diagnósticas.

➤ **Detección Inmunohistoquímica**
La proteína alterada PrP-Sc que es una forma isomorfa de la de la proteína celular normal PrP, se acumula en los tejidos nerviosos formando placas fácilmente identificables por medio de anticuerpos específicos anti PrP.

La disponibilidad de un test rápido y seguro, sería el mayor avance en relación con el tema de la EEB.

Algunos test fueron desarrollados, basados en estos marcadores (PrP alterada), por varios grupos. En este sentido, el 19 de mayo de 1999, la Comisión Europea, hizo un llamamiento a través del Diario Oficial de las Comunidades Europeas, con el fin evaluar y obtener información concreta sobre la ejecución de los test que estaban disponibles o en avanzado estado de desarrollo para el diagnóstico de la EEB.

Nueve solicitudes fueron recibidas para diez test. Los test seleccionados para participar en la evaluación fueron:

- 1.- E.G & Wallac Ltd. (Reino Unido)
- 2.- Prionics A.G (Suiza)
- 3.- Enfer Technology Ltd. (Irlanda)
- 4.- Comissariat a L'Energie Atomique (Francia)

EVALUACIÓN DE LOS TEST POR LA COMISIÓN EUROPEA

El proceso de evaluación, se basó en cuatro parámetros:

- 1.- **Especificidad.** Es la proporción de animales negativos en el test, sobre una población sana.
- 2.- **Sensibilidad.** Es el porcentaje de animales positivos en el test sobre una población infectada.
- 3.- **Detección de límites.** Es la cantidad más pequeña detectada por el test.



4.- **Repetibilidad.** Un número de muestras especialmente preparadas, obtenidas de una misma mezcla de tejido.

Otros factores, tales como la facilidad de uso y la rapidez de la ejecución, fueron tenidos en cuenta.

Origen de las muestras:

- Las muestras positivas provenían de bovinos naturalmente infectados

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	DETECCION DE DILUCION 1/10	REPETIBILIDAD	DURACION
E. G&WALLAAC	70%	90%	0/20	NO	24H.
PRIONICS	100%	100%	15/20	SI	8H.
ENFER	100%	100%	20/20	SI	4H.
C.E.A	100%	100%	20/20	SI	24H.

con EEB, los cuales, mostraban signos clínicos de enfermedad. Confirmadas histológicamente todas. Fueron proporcionadas por el Laboratorio Central de Veterinaria de Weybridge (Reino Unido).

- Las muestras negativas, fueron recogidas en Nueva Zelanda, procedentes de bovinos sanos de más de 4 años.

Resultados de la evaluación:

Cuatro semanas fueron necesarias para completar los test.

- **E.G & Wallac**, utiliza un sistema de detección, basado en el método DELFIA (Disociation Enhanced Lanthanide Fluoro Immuno Assay). La detección de la PrP viene dada por la resolución en el tiempo de la reacción fluorimétrica de un quelato de lantánido unido a un anticuerpo de detección primario o secundario.

- **Prionics AG**, utiliza un Western blotting para la detección de la PrP.

- **Enfer Ltd.**, utiliza un ELISA quimioluminiscente, que usa un anticuerpo policlonal anti PrP.

- **CEA**, utiliza un ELISA sandwich, con dos anticuerpos monoclonales.

Los criterios que han llevado al **test Prionics** a casi todos los países de la U.E han sido:



1. **Precisión.** Es el único test de los evaluados con la máxima especificidad y sensibilidad sin necesidad de repeticiones. Distingue animales sanos de animales con EET (Encefalopatía espongiforme transmisible). Distingue EET de otras alteraciones neurológicas.

2. **Sensibilidad.** Detecta casos subclínicos, detecta animales con EET, antes de que puedan ser diagnosticados por histopatología.

3. **Fiabilidad.** Permite el diagnóstico cuando las muestras de tejido se encuentran bajo condiciones adversas, tales como: procesos autolíticos, crecimiento microbiano..., garantizando la prevención de falsos positivos. Es el único test, que se desarrolló en la evaluación, sin problemas técnicos tales como las contaminaciones cruzadas.





4. Facilidad de uso. Está disponible en un kit, que contiene los principales reactivos,, especialmente desarrollados para usar en los laboratorios, en un tiempo aproximado de 8 horas.

PRIONICS-CHECK EN LA U.A.S.A

➤ Fundamento.

El desarrollo del test está basado fundamentalmente, en la detección de la proteína alterada PrP-Sc, que se diferencia de la PrP-normal, PrP-C, (presente en la membrana celular) por su resistencia parcial a la degradación por las proteasa . Bajo tratamiento con proteasas, la forma normal de la PrP se destruye, mientras que la PrP-Sc, se degrada parcialmente de su tamaño original de 32-35KD a un tamaño menor de 27-30 KD.

ESQUEMA DEL PROCEDIMIENTO:

- I.- Toma de muestras
- II.- Recepción de las muestras. Registro en la Base de Datos
- III.- Procesado de las muestras:
 - Homogeneizado
 - Digestión
- IV.- Preparación para la Electroforesis:
 - Desnaturalización de las muestras
 - Electroforesis en gel
- V.- Western Blotting:
 - Transferencia
 - Determinación inmunológica.
 - Revelado.
- VI.- Interpretación de los Resultados.



En una primera fase, el tratamiento con proteasa, genera el fragmento PrP-27-30, a la vez que destruye la PrP-normal. En una segunda fase, la PrP-27-30, se identifica por su actividad inmunológica frente a los anticuerpos anti PrP y por su tamaño, mediante una técnica Western-Blot optimizada.

➤ Procedimiento.

➤ Toma de muestras.

En el matadero, o en su caso, en explotación, se toma la muestra del tronco del encéfalo, concretamente de la región del óbex. El método está

optimizado para la utilización de esta región, lugar de mayor acúmulo de Prion-Sc. La forma de extracción es la de introducción de una cucharilla especial por el “Foramen Magnum” lo que facilita la extracción del tronco del encéfalo lugar dónde se encuentra situado el óbex.

Las muestras se transportan refrigeradas al laboratorio, debidamente identificadas y cumplimentado el modelo de remisión de muestras (en el caso de nuestro Laboratorio el correspondiente al Modelo.1 del RD 3454).



Visita de la consellera al laboratorio (U.A.S.A.), donde se realiza el test “Prionics-Check”.

➤ **Procesado de las muestras.**

Se pesa aproximadamente 0.5 gr. de tejido nervioso de la zona del óbex y se somete a una:

– **homogeneización**, con buffer de homogeneización(al 10%) en un homogeneizador politron a 20.000 rpm,durante un minuto.

– **digestión**, con proteinasa K, a 47°C durante 30 minutos.

Con ello, conseguimos una estabilización de la PrP-Sc (resistente a la acción de las enzimas de digestión) y una desestabilización de la PrP-normal, que queda degradada. El proceso se paraliza por la inactivación de la proteasa.



➤ **Electroforesis.**

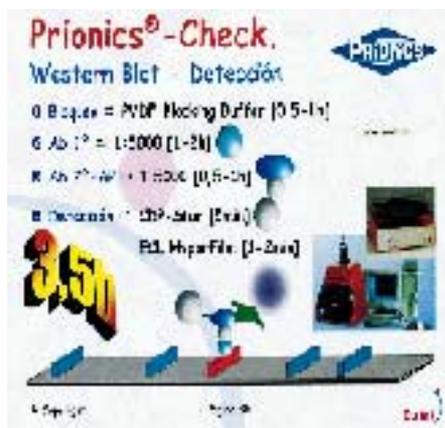
Se diluyen las muestras 1:1 en buffer SDS, se calientan a 95°C durante 5'(desnaturalización). Se cargan las muestras sobre un gel de poliacrilamida al 12%, para someterlo a una corriente eléctrica, en una cubeta de electroforesis, con el fin de obtener una separación de las proteínas por sus pesos moleculares.(200V – 1 hora). Los Geles están preparados para correr 8 muestras dobles y una muestra control (con PrPc y marcadores de Peso Molecular).

➤ **Transferencia. Western-Blot.**

Una vez separadas las proteínas en gel, se transfieren a una membrana de Polivinilo difluorado (PVDF) en una cubeta de transferencia por medio de corriente eléctrica .De esta forma, es más sencillo realizar una determinación inmunológica sobre las proteínas en una membrana que sobre el gel.

➤ **Determinación inmunológica.**

Se incuba la membrana con un anticuerpo primario monoclonal (mAb 6H4) y posteriormente con un anticuerpo policlonal secundario, unido a una enzima, la fosfatasa alcalina, que servirá para revelar la unión, Ag-Ac, por medio de la emisión lumínica de un sustrato luminiscente(CDP-Star), el cual impresiona un film radiográfico.



➤ **Revelado.**

Tras uno ó dos segundos de impresión de la membrana sobre el film.

➤ **Interpretación de los resultados.**

Tras el revelado, los criterios para determinar la positividad de las bandas que aparecen serían los siguientes:

- Banda de PrP presente tras la digestión con la Proteinasa K.
- Esta banda aparece con un peso molecular inferior a la PrP Control.
- Aparecen en total tres bandas a poca distancia del residuo de proteinasa K, que según la intensidad que presentan pueden dar la imagen de un "borrón".

TEST DE DIAGNÓSTICO ANTE-MORTEM

Los trabajos para el desarrollo de un test ante-mortem que permitiera el diagnóstico de la BSE, (ó EEB) comenzaron en los años noventa. En el Laboratorio Central de Veterinaria, desarrollaron un test químico de orina, para la identificación de BSE en bovino. Antes había sido usado para ovejas



infectadas de scrapie. El método detectaba tres metabolitos en orina: ácido úrico, sulfato de catecolamina y otro desconocido en aquel momento, cuyas concentraciones podían ser usadas para el diagnóstico de BSE. Sin embargo, se obtenían muchos falsos positivos en los resultados iniciales.





En 1998, un grupo francés, aisló un metabolito Marker T (se pensó que era el metabolito desconocido previamente identificado por el LCV) en la orina de los bovinos infectados con BSE.

Algunas proteínas marcadoras de la BSE, diferentes a la PrP-sc, tales como la proteína 14-3-3 y la S100 han sido detectadas en el fluido cerebro-espinal de los bovinos afectados con BSE. Sin embargo ninguno de los test de éstos marcadores es suficientemente fiable para el diagnóstico de BSE.

En 1999, un prometedor test de inmuno-electroforesis capilar (CIE) fue introducido para la detección ante-mortem. Este test, está basado, en la competición entre PrP y PrP sintético marcado con fluoresceína por la unión a anticuerpos específicos. Cuando el PrP está presente, compete con el péptido marcado por

su unión al anticuerpo y la fluoresceína se pone de manifiesto con un detector inducido por láser. Las formas normales y anormales de PrP se distinguen sometiendo las muestras a digestión con proteinasa K antes de la extracción. Esta técnica detecta PrP-BSE en extractos de células blancas de la sangre, de animales infectados, antes de la aparición de los primeros signos clínicos de la enfermedad.

VALORACIÓN DE NUEVOS TEST POR LA UNIÓN EUROPEA

En la actualidad, la Comisión Europea está valorando cinco nuevos Test pos-mortem para el Diagnóstico de la Encefalopatía Espongiforme Bovina y otras Encefalopatías animales. El

resultado de esta nueva valoración se estima que se presente en la Primavera de este año.

El trabajo se enfoca de forma parecida a la primera validación de Test realizada por la UE, pero con series más pequeñas de muestras. Un nuevo parámetro de valoración será la habilidad que presenten los Test para distinguir los distintos tipos de Encefalopatías.

Los test aceptados para la valoración son los siguientes:

- 1.-ID-Lelystad, de Holanda.
- 2.-Imperial College of Science Technology and medicine, del Reino Unido.
- 3.-El Instituto de Enfermedades Neurodegenerativas / Universidad de California, San Francisco (IND/UCSF), USA.
- 4.-Perkin Elmer Life Sciences, Reino Unido.
- 5.-Prionics AG, (Suiza) con una metodología distinta a la del Test en actual vigencia y aplicación.

CONCLUSIONES

Si en todas las enfermedades es importante tener un método diagnóstico fiable, más lo es en este tipo de enfermedad con repercusión directa en los consumidores y su salud. Es imprescindible





dible asegurar la inocuidad de cada uno de los productos derivados que van a pasar a la cadena alimentaria.

Como resumen, podemos concluir que el Diagnóstico de la EEB actual es un diagnóstico post-mortem basado en la aplicación de alguno de los test rápidos validados por la UE y confirmado por la histopatología o la Inmunohistoquímica. Actualmente se están valorando nuevos cinco test Pos-Mortem, valoración que en breve se transformará en un informe que pronto estará publicado y que ampliará con seguridad el número de test rápidos validados por la UE.

En cuanto los test Ante Mortem o In Vivo, que actualmente se encuentran en desarrollo y pendientes de validación, podríamos resumir que el fundamento de los mismos se encamina en dos direcciones:

-Tests no específicos, en los que se determinan proteínas que se encuentran presentes en orina, sangre o líquido cefalo-raquídeo, cuyo valor diagnóstico se basa en la comparación con la presencia y cantidad de las mismas en individuos sanos.

-Tests específicos, basados en ensayos de captura y competición con receptores celulares de membrana o péptidos sintéticos y visualización por anticuerpos de gran afinidad, o en ensayos basados en la separación de la PrPsc y su posterior identificación con anticuerpos de gran afinidad.

En cualquier caso, el diagnóstico en las EET en general sufrirá, con seguridad, un gran desarrollo en los años venideros lo que hará que el panorama del mismo cambie a gran velocidad.



BIBLIOGRAFIA

- The Evaluation of Test for the Diagnosis of Transmissible Spongiform Encephalopathies in Bovines. EUROPEAN COMMISSION. Directorate general XXIV. Consumer Policy and Consumer health Protection. 8/06/99
- BSE: Commission evaluating five new tests. (<http://europa.eu.int/>)
- Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP-sc detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) O. Scaller y col. Acta Neuropathologie (1999) 99:437-443
- WHO Consultation on Diagnostic Procedures for transmissible Spongiform Encephalopathies, Needs for Reagents. (<http://www.who.org>)
- The BSE Inquiry: The Report. (<http://www.bseinquiry.gov.uk>)
- Manual of standards for diagnostic test and vaccines. OIE.
- Encefalopatía Espongiforme Bovina (BSE). J.A. García Jalón y col. 1997.
- Information Concerning BSE for the Scientific World. (<http://www.bvet.ch>)

